

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

7500.180.50  
381  
000

BIBLIOTECA UCM



5306071276



**CAPILARES CEREBELOSOS Y SU MICROAMBIENTE:  
ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL E  
INMUNOCITOQUÍMICO**

**RAQUEL DE LOS REYES GRAGERA MARTÍNEZ**  
**MADRID, 1.993**

R 22967

Vº Bº LOS DIRECTORES

ENRIQUETA MUÑIZ

RICARDO MARTÍNEZ

RAQUEL GRAGERA

Dedicado a los científicos que más admiro, mis queridos Padres, José María y Raquel, quienes han guiado a sus hijos por caminos de inquietud científica, sembrando en nosotros la semilla de la ciencia y la curiosidad. Nada en este mundo podrá bastar para agradecerles todo cuanto han sido y son para mí. Ojalá Dios nos guarde un mundo en el que sea posible recompensar tatísimo Amor.

A mis adorables hermanos, José María, Fernando María, María del Mar y Javier, y a Fausto, con quienes compartir la aventura de vivir resulta del todo gratificante. Por sus constantes muestras de amor, confianza, generosidad y entrega.

### AGRADECIMIENTOS:

Aunque acepto la total responsabilidad del contenido de esta obra, me siento en deuda con numerosas personas que han tenido una valiosa contribución en su desarrollo. Pecaría de ingratitud si no mencionase la inestimable colaboración recibida, y de inmodestia, si no rogase a los lectores que tengan la amabilidad de indicarme las omisiones e imperfecciones en que hubiese incurrido, «errare humanum est».

En primer lugar, deseo expresar mi inmensa gratitud a la Dra. Enriqueta Muñiz, por compartir conmigo todos los instantes de la realización de esta tesis. Su entrega íntegra, su esmero y su amistad, han sido insustituibles e imprescindibles en la finalización de esta obra. Por abrirme siempre nuevas puertas, dejarse la piel por los demás y no cerrarme nunca su inmenso corazón. Así mismo, mi infinita gratitud al Dr. Ricardo Martínez-Rodríguez, quien siempre me ha brindado todo cuanto he necesitado, sin escatimar sacrificio y cariño. Su entusiasmo en la vida y su investigación rigurosa han sido ejemplo constante para mí. Gracias por contagiarme tus sueños y hacerme disfrutar del trabajo.

Este trabajo no habría tenido su fin sin el entusiasmo, interés y amabilidad del Dr. D. Benjamín Fernández Ruiz. Desde estas líneas le ofezco el testimonio de mi más afectuosa

gratitud.

Al Dr. D. Agustín Zapata, Director del Departamento de Biología Celular de la Facultad de C.C. Biológicas de la U. C. M. de Madrid, de quien admiro su absoluta entrega a la ciencia, por permitirme la realización de mi trabajo.

Deseo testimoniar así mismo, mi vivo reconocimiento a todos aquellos que me han rodeado de forma constante de muestras de ánimo y sincero afecto durante la larga aventura que ha supuesto este trabajo. He tenido la inmensa suerte de contar con Fausto y Pilar Moreno, que han sabido estar siempre cerca para ofrecerme siempre lo mejor de si mismos, a Mariano y Cloria, por su comprensión y amistad sincera. A Ana María, la Dra Alicia Tonda y Francisco, compañeros admirables en el laboratorio, por ayudarme en todo. Mis agradecimientos estarían incompletos si no incluyese a la Dra. Lourdes Jiménez, las inolvidables horas compartidas figuran entre los mejores recuerdos de mis primeros pasos en la ciencia.

A todos los que forman parte del Departamento de Biología Celular. Sería muy difícil agradecerles uno a uno su valiosa ayuda. Deseo expresar un especial agradecimiento a la Dra. Elvira Fernández, Dra. Margarita Muñoz, Dr. Agustín González, Dr. Iñigo Azcoitia, Dra. Maite Solas, Dra. Pilar Alvarez, Dr. Alfredo Baratas. Mis efusivas gracias a Maria José, Lucre y Alfonso, por



su constante ayuda. A todos muchísimas gracias, vuestra aportación humana, científica y técnica ha sido transcendental en que la finalización de esta tesis haya sido posible.

Puesto que gran parte de mi trabajo ha sido posible gracias a la colaboración con otros departamentos y centros, deseo agradecer vivamente a aquellos que me han dedicado su precioso tiempo. Al Dr. Jesús Benito y a todos los miembros de su equipo, al Dr. Antonio López-Bravo, Director del Servicio de Anatomía Patológica y a todos y cada uno de los que forman parte del servicio. Sin la desinteresada ayuda del personal del Instituto Cajal del CSIC no habría sido posible el trabajo. Deseo agradecer cordialmente al Dr. Ricardo Martínez Murillo, al servicio de Microscopía Electrónica y a todos los que desinteresadamente me han ayudado.

Finalmente, y no con ello en último lugar, deseo ofrecer el testimonio de mi inmensa gratitud a todas esas personas que admiro profundamente y que, con sus testimonios, han contribuido a mi formación espiritual, humana y académica, enseñándome a VIVIR. A mis Padres y Hermanos, D. Francisco Espinosa S.J., D. Manuel Abella S.J., D. Luis Emilio Gil de Vergara S.J., Dr. Joaquín Plumet, Ana Garriges R.M. y Pepa Obando Carvajal R.M. Desde aquí deseo asociar a este homenaje el recuerdo de mi tía Berta, a la que tanto le hubiese gustado ver terminada esta obra; siempre tendré en mi corazón el testimonio de su sencillez y humildad.

Para terminar, deseo compartir con vosotros las palabras de D. Santiago Ramón y Cajal, en su discurso de ingreso en las Academia de las Ciencias, que siempre me han interpelado y que todo investigador debe tener presente. «La maestría de los métodos, particularmente de las Ciencias Biológicas, es tan transcendental que, sin temor a equivocación, se puede afirmar que los grandes descubrimientos corren a cargo de los técnicos más primorosos: de aquellos sabios que han profundizado, a favor de perseverantes ensayos, todos los secretos de uno o varios recursos analíticos».

**ÍNDICE**

## INDICE

### I.- INTRODUCCIÓN.

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.-   | Caracteres generales de la Barrera Hematoencefálica .... | 2  |
| 2.-   | Transporte a través de la Barrera .....                  | 20 |
| 2.a.- | Transporte de H <sub>2</sub> O .....                     | 23 |
| 2.b.- | Transporte de electrólitos .....                         | 24 |
| 2.c.- | Transporte de aminoácidos .....                          | 25 |
| 2.d.- | Transporte de macromoléculas .....                       | 26 |
| 2.e.- | Transporte de monosacáridos .....                        | 29 |
| 2.f.- | Transporte de neuropéptidos .....                        | 29 |
| 3.-   | Control neural del flujo microvascular en el S.N.C. .... | 31 |
|       | Acción de los diversos neurotransmisores.                |    |
| 3.a.- | Catecolaminas .....                                      | 34 |
| 3.b.- | Dopamina .....   | 37 |
| 3.c.- | Serotonina .....   | 38 |
| 3.d.- | Histamina .....  | 39 |
| 3.e.- | GABA .....   | 41 |
| 3.f.- | Hormona paratiroidea (PTH) .....                         | 42 |
| 3.g.- | Péptidos neuroactivos .....                              | 41 |
| 3.h.- | Acetilcolina .....                                       | 45 |
| 3.i.- | Purinas .....  | 46 |
| 4.-   | Filogenia de la Barrera Hematoencefàlica .....           | 50 |
| 5.-   | Embriología de la Barrera Hematoencefálica .....         | 53 |
| 6.-   | Consideraciones históricas .....                         | 57 |
| 7.-   | Organización morfofuncional del cerebelo .....           | 61 |
| 8.-   | Inmunohistoquímica .....                                 | 67 |

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| II.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS..... | 70 |
|-------------------------------------|----|

### III.- MATERIAL Y MÉTODOS:

|   |    |
|---|----|
| 1.- MATERIAL .....  | 75 |
| 2.- MÉTODOS.  |    |
| 2.1.- Microscopía electrónica de transmisión .....        | 75 |
| 2.2.- Obtención de antisueros.                            |    |
| 2.2.1.- anti-cAATasa .....                                | 78 |
| 2.2.1.1.- Aislamiento y purificación del<br>antígeno..... | 78 |
| 2.2.1.2.- Obtención del antisuero.....                    | 80 |
| 2.2.2.- anti-GABA.  |    |
| 2.2.2.1.- Obtención del complejo antigénico.....          | 84 |
| 2.2.2.2.- Obtención del antisuero.....                    | 84 |
| 2.2.3.- anti-Tiamina.                                     |    |
| 2.2.3.1.- Obtención del complejo antigénico.....          | 86 |
| 2.2.3.2.- Obtención del antisuero.....                    | 87 |
| 2.2.4.- anti-fosfocreatina.                               |    |
| 2.2.4.1.- Obtención del complejo antigénico.....          | 88 |
| 2.2.4.2.- Obtención del antisuero.....                    | 89 |
| 2.3.- Método inmunohistoquímico del PAP.....              | 91 |
| 2.3.1.- Antisueros policlonales.....                      | 93 |
| 2.3.2.- Antisueros monoclonales.....                      | 94 |
| 2.3.3.- Procesamiento del material.....                   | 96 |
| 2.3.4.- Controles de especificidad.                       |    |
| 2.3.4.1.- De los anticuerpos.....                         | 98 |
| 2.3.4.2.- De la reacción inmunohistoquímica....           | 98 |

#### IV.- RESULTADOS:

|  |     |
|--|-----|
| 1.- Estudio ultraestructural de los capilares cerebelosos<br>y su microambiente..... | 101 |
| 2.- Obtención del antígeno cAATasa puro.....   | 111 |
| 3.- Obtención del anticuerpo específico frente a la<br>cAATasa.....                  | 112 |
| 4.- Obtención del antisuero específico frente a GABA.....                            | 113 |
| 5.- Obtención del antisuero específico frente a Tiamina.....                         | 114 |
| 6.- Obtención del antisuero específico frente a<br>Fosfocreatina.....                | 116 |
| 7.- Inmunolocalización de GABA.....  | 117 |
| 8.- Inmunolocalización de GAD.....   | 121 |
| 9.- Inmunolocalización de Taurina.....   | 125 |
| 10.- Inmunolocalización de Glicina.....  | 129 |
| 11.- Inmunolocalización de Serotonina.....   | 132 |
| 12.- Inmunolocalización de Tiamina.....  | 135 |
| 13.- Inmunolocalización de Aspartato aminotransferasa<br>(AATasa).....               | 138 |
| 14.- Inmunolocalización de ATPasa $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ .....                   | 141 |
| 15.- Inmunolocalización de fosfocreatina.....  | 142 |
| 16.- Inmunolocalización de Clatrina.....   | 144 |
| 17.- Inmunolocalización de $\alpha$ -actina.....                                     | 147 |

## V.- DISCUSIÓN:

|  |     |
|--|-----|
| 1.- Barrera Hematoencefálica: ultraestructura y presencia de moléculas con implicación funcional ... | 152 |
| 1.1.- Células endoteliales .....   | 153 |
| 1.2.- Membrana basal .....   | 157 |
| 1.3.- Pericitos .....  | 158 |
| 1.4.- Glía perivascular .....  | 161 |
| 1.5.- Componentes nerviosos relacionados con los capilares cerebelosos .....                         | 166 |
| 2.- Neuromediadores y enzimas en la Barrera Hematoencefálica y su microambiente .....                | 170 |
| 2.1.- Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y Glutámico decarboxilasa (GAD) .....                     | 170 |
| 2.2.- Ácido 2-aminoetanosulfónico: taurina .....   | 174 |
| 2.3.- Glicina .....  | 180 |
| 2.4.- Serotonina .....   | 182 |
| 2.5.- Tiamina .....  | 183 |
| 2.6.- Aspartato aminotransferasa (AATasa) .....  | 185 |

|                        |     |
|------------------------|-----|
| VI. CONCLUSIONES. .... | 187 |
|------------------------|-----|

|                          |     |
|--------------------------|-----|
| VII.- BIBLIOGRAFÍA ..... | 191 |
|--------------------------|-----|

|                      |     |
|----------------------|-----|
| VIII.- FIGURAS ..... | 245 |
|----------------------|-----|

**I.- INTRODUCCIÓN.**



## 1.- CARACTERES GENERALES DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA:

El aislamiento del medio cerebral interno y la homeostasis resultan imprescindibles para el mantenimiento de la función cerebral. Ambos fenómenos tienen lugar en la pared de los capilares cerebrales, a través de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos que constituyen la Barrera Hematoencefálica (BHE).

El funcionamiento cerebral normal precisa de un medio interno estable, diferente del existente en otros órganos corporales. Los órganos periféricos, son capaces de tolerar las pequeñas fluctuaciones en los niveles de hormonas, nutrientes, aminoácidos, vitaminas e iones, que se producen en respuesta a la ingesta. El Sistema Nervioso Central (S.N.C.), por el contrario, ha de mantener un microambiente único, ya que variaciones relativamente insignificantes en la composición del mismo, pueden afectar de forma negativa a la actividad electrofisiológica de las neuronas que controlan los procesos de integración en el S.N.C. De hecho, cambios relativamente insignificantes en la concentración de  $K^+$ , pueden afectar de forma adversa a la actividad neuronal.

La estabilidad del microambiente cerebral requiere del desarrollo de una homeostasis dinámica, capaz de asegurar que neuronas, sinápsis y sistemas neuronales, puedan recibir, procesar, almacenar, transferir, integrar y utilizar las múltiples informaciones que resultan esenciales para la función nerviosa correcta y normal.

La integridad de la BHE resulta esencial para el funcionamiento correcto del cerebro, (Risau et al., 1990). El extravasado de albúmina sérica, desde los capilares cerebrales hacia los espacios perivasculares, resulta ser un indicativo de la alteración en la integridad de la barrera (Blakemore, 1969; Wilmers et al., 1979; Wolman et al., 1981). Es por ello, que en el análisis de la integridad de la BHE se han utilizado técnicas inmunohistoquímicas de localización de albúmina sérica (Wilmers et al., 1979). Así mismo, el colorante Azul de Evans, un pequeño trazador fluorescente que se combina rápidamente con albúmina, resulta útil como marcador de albúmina extravasada (Wolman et al., 1981; Nitsch et al., 1983; Janzer et al., 1987).

La BHE está implicada, principalmente, en tres funciones: protección del medio cerebral interno del medio sanguíneo, transporte y modificación selectivos, y metabolismo de las sustancias presentes tanto en la sangre como en el medio cerebral.

El aislamiento del medio cerebral se debe principalmente a la casi o absoluta impermeabilidad de la BHE a moléculas hidrofílicas y a mecanismos de transporte activo y de biotransformación. Los capilares cerebrales constituyen, según Brightman (1977) y Pardridge (1983) el 99% de la BHE.

La microvascularización cerebral se compone básicamente de tres tipos celulares. Las células endoteliales de los capilares cerebrales, junto con los pericitos, células gliales

perivasculares y la lámina basal circundante, constituyen la estructura morfológica encargada del mantenimiento de la barrera selectiva entre la sangre y el medio cerebral (Algers et al., 1986; Perlmutter & Chui, 1990).

Las células de los capilares cerebrales son células «únicas» (Betz, 1989, 1990), si se comparan con las que constituyen cualquier otro endotelio capilar. Estas células, de 1000-1500 Å de espesor, que configuran conductos de unas 3μ de diámetro, se hallan rodeadas por los pericitos, una lámina basal, formada por aposición de material endotelial y astrocítico (Schmidley et al., 1986) y las propias prolongaciones gliales.

Las uniones estrechas interendoteliales, constituyen una de las características más importantes de la BHE, con respecto al aislamiento del medio cerebral interno de la circulación sanguínea (Reese & Karnowsky, 1967; Brightman & Reese, 1969; Burns & Kruckeberg, 1989). Los bordes de las células endoteliales aparecen imbricados y sellados mediante estas uniones, formando un cinturón continuo alrededor de los capilares (Reese et al., 1960; Brightman et al., 1969; Nagy et al., 1983). En réplicas realizadas utilizando técnicas de criofractura, las uniones estrechas aparecen continuas, anastomosadas y carentes de uniones gaps (Connel & Mercer, 1974; Dermietzel, 1975; Shivers et al., 1985; Nagy et al., 1983).

Este precintado del endotelio capilar conduce a la formación de un auténtico tejido epitelial polarizado (Betz et al., 1980,

1984; Dertmietzel & Krause, 1991), concepto morfo-funcional importante en el estudio de la BHE. La región luminal de la membrana plasmática de la célula endotelial, se relaciona directamente con el medio sanguíneo circulante, mientras que la porción abluminal o antiluminal, se encuentra en estrecho contacto con el resto de los componentes de la BHE y las estructuras de naturaleza nerviosa, constituyendo el microambiente de los capilares cerebrales. El mantenimiento de microdominios de membrana, marcadamente diferentes entre las regiones luminal y abluminal, constituye la base estructural de las propiedades bioquímicas y funcionales que caracterizan a la BHE.

La regionalización de la membrana plasmática, implica la organización de la misma en microdominios, capaces de actuar de forma específica. Ello permite, de este modo, el transporte transcelular activo, el mantenimiento constante de las concentraciones de  $K^+$ , la inactivación de ciertos neurotransmisores, la eliminación de desechos metabólicos, la secreción de fluido y la respuesta específica y diferencial de la propia célula endotelial a neurotransmisores, hormonas y factores cerebrales, en base a su presencia en una u otra región de la membrana plasmática endotelial. La polaridad celular permite, así mismo, a la célula endotelial, incorporar y metabolizar un substrato desde una región determinada, manteniendo, al mismo tiempo, la actividad endotelial de barrera que evita que dicho substrato atravesase la membrana en la dirección contraria.

El endotelio cerebral puede clasificarse como un epitelio cerrado, en base a su resistencia eléctrica de unos  $2 \cdot 10^3 \Omega \text{ cm}^{-2}$ , valor semejante al observado en epidermis de anfibios (Crone & Christensen, 1981a; Crone & Olensen, 1981b; Olensen & Crone, 1983). Esta resistencia eléctrica refleja la baja permeabilidad iónica del endotelio cerebral (Crone, 1986a), cuyo coeficiente de permeabilidad es la centésima parte del observado en los capilares del tejido muscular (Hansen et al., 1977; Crone, 1984a, 1984b).

La conductancia hidráulica de la BHE es muy baja (Fenstermacher & Johnson, 1966), siendo el coeficiente de filtración, cientos de veces menor que el calculado en los capilares del tejido muscular (Crone, 1984b).

La utilización de técnicas histoquímicas, ha facilitado la verificación de algunas de las características que reflejan la polaridad celular. Así, el empleo de sustancias radiactivas (técnicas de autorradiografía), sustratos enzimáticos (técnicas histoenzimológicas) y anticuerpos específicos (técnicas inmunocitoquímicas), han permitido conocer datos de relevante interés en el mantenimiento de la polarización celular. En este sentido, la aplicación de estas diversas metodologías ha permitido localizar a la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en la membrana abluminal de la célula endotelial (Firth, 1977; Betz et al., 1980, 1984; Vorbrodt, 1991a; Inomata et al., 1984; Kato & Nakamura, 1987; Latker et al., 1987) o en la porción luminal de la célula (Vorbrodt & Trowbridge, 1991b), fosfatasa alcalina en ambas

regiones del endotelio cerebral de rata (Betz et al., 1980; Kreutberg, 1983; Inomata et al., 1984; Kato & Nakamura, 1987; Latker et al., 1987; Vorbrodt & Trowbridge, 1991b) o únicamente en la porción abluminal (Masuzawa, 1983); 5-nucleotidasa en ambas regiones de la membrana en rata (Vorbrodt & Trowbridge, 1991b), aunque siendo más intensa en la membrana antiluminal (Inomata et al., 1984; Nag, 1987a);  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en ambas membranas en rata (Joó, 1979), predominando sin embargo en la región abluminal (Inomata et al., 1984; Nag, 1987a); actividad  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa intensa en la membrana antiluminal (Inomata et al., 1984); N-glutamyl transpeptidasa en la región luminal en rata (Orlowski et al., 1974; Budi Santos & Bär, 1986), enzima ausente en capilares no cerebrales (Orlowski et al., 1974); adenilato ciclase en ambas regiones de la membrana (Joó, 1975; Szumanska, 1984; Vorbrodt et al., 1984b), receptor de Con-A en la membrana luminal de rata (Nag, 1985); angiotensina convertasa en la porción luminal (Pickel, 1986); actividad TPPasa (Tiaminopirofosfatasa) asociada principalmente a la membrana plasmática antiluminal (Inomata et al., 1984); actividad TTPasa (Tiamina trifosfatasa) localizada en las membranas lateral y antiluminal principalmente (Inomata et al., 1984); antígeno de barrera endotelial (EBA) en la membrana luminal (Rosenstein et al., 1992).

La polaridad celular puede ser, así mismo, confirmada en base a la existencia de un transporte transcelular activo de sustancias que no son rápidamente producidas o consumidas en cerebro, como ocurre en el caso de ciertos aminoácidos (Lerma et al., 1986; Cangiano et al., 1989) y el  $\text{K}^+$  (Katzman, 1976),

manteniendo en el fluido extracelular concentraciones más bajas de este ión que en el plasma. La permeabilidad del  $K^+$  en la dirección sangre-medio cerebral, es muy baja (Hansen, 1977); sin embargo, su salida desde el cerebro a la sangre, parece corresponder a un transporte dependiente de la concentración y sensible a ouabaína (inhibidor de la ATPasa  $Na^+/K^+$ ) (Bradbury & Stulková, 1970), capaz de mantener constante la concentración de  $K^+$  en el espacio extracelular cerebral.

Las células endoteliales de los capilares cerebrales se han caracterizado clásicamente, por la escasez de vesículas de pinocitosis o invaginaciones de la membrana (Reese et al., 1967; Westergaard & Brightman, 1973; Brightman, 1977); a pesar de que otros autores han propuesto la existencia de una red túbulo-vesicular (Lossinsky et al., 1970). La presencia de enzimas capaces de inactivar neurotransmisores circulantes (Palmer et al., 1989) y un elevado número de mitocondrias, metabólicamente activas, y responsables de la energía requerida para el transporte transcelular activo entre la sangre y el cerebro, constituyen características importantes de las células endoteliales de los capilares cerebrales. Olendorf et al. (1977a) estimaron que el porcentaje en el volumen de la célula endotelial de los capilares cerebrales ocupado por mitocondrias es de un 8-11%, cifra elevada comparada con el 2-5% en regiones sistémicas o no formadoras de barrera. La disminución del número de mitocondrias que se produce paralelamente al envejecimiento (Burns et al., 1979, 1981, 1983) parece estar relacionado con la toxicidad de los radicales libres y peróxidos sobre la actividad

mitocondrial, alterándose los lípidos de membrana y el ADN mitocondriales, con lo que resultan orgánulos celulares carentes de capacidad de división (Ecomos et al., 1980).

Estas peculiares características, exclusivas del endotelio cerebral, parecen estar inducidas, en primer lugar, por la presencia del tejido nervioso, hipótesis de la "inducción tisular" (Stewart & Wiley, 1981). Los capilares cerebrales no están predeterminados, sino que la adquisición de las particulares características de la BHE, resultan de una inducción, cuyo origen está según estos autores, en el tejido nervioso. En segundo lugar, las prolongaciones de la glia astrocitaria, que alcanzan a los vasos sanguíneos en la mayor parte del cerebro, parecen elaborar señales que inducen en las células endoteliales las características únicas en relación con la función de la barrera (Davson & Olendorf, 1967; Stewart & Wiley, 1981; Goldstein et al., 1986a; Janzer & Raff, 1987; Tao-Chen et al., 1987, 1988; Arthur et al., 1987; Meyer et al., 1991), induciendo la polaridad celular (Beck et al., 1984; Debault & Cancilla, 1980). Las irregularidades observadas en el envoltorio glial perivascular, en muchos tumores cerebrales, y su correlación con la destrucción de la BHE, acrecienta la importancia de la presencia de los astrocitos en el mantenimiento de la BHE (Greig, 1988).

Al parecer, los mecanismos que gobiernan esta inducción no se limitan a las interacciones entre glía y células endoteliales, sino que por consiguiente, tanto la presencia de



la glía como del tejido nervioso perivasculares, confieren a los capilares cerebrales las características de barrera hematoencefálica (Dertmietzel & Krause, 1991; Tontsch & Bauer, 1991).

La barrera hematoencefálica representa un sistema celular complejo; a pesar de que las células endoteliales constituyen la barrera propiamente dicha, la interacción de todas las estirpes celulares, parece ser indispensable para la inducción y el mantenimiento de la barrera.

Los pericitos, término introducido por Zimmermann (1923), también denominadas células murales o de Rouget (Krogh, 1919), son células adventicias (Marchand, 1898; Herzog, 1914), cuya presencia ha sido demostrada en los capilares de todos los tejidos y en un amplio abanico de especies. La identificación de esta estirpe celular, se basa aún en la definición histológica de células adosadas a la membrana basal de la célula endotelial en su región abluminal, con la que mantiene una estrecha relación estructural (Tilton, 1991).

Desde la primera descripción ultraestructural de estas células en el S.N.C., concretamente en la corteza cerebral (Farquhar & Hartman, 1956), la situación anatómica periendotelial de estos ha sido foco de multitud de investigaciones (Maynard et al., 1957; Donahue & Papas, 1961; Cancilla et al., 1972; Dodson, 1973; Kristensson & Olsson, 1973; Lafarga & Palacios, 1975; Lafarga & Hervas, 1978; Castejón, 1984). Los pericitos aparecen

de forma más patente en los capilares del tejido nervioso que en el resto de los vasos (Simionescu et al., 1988).

La estructura de los pericitos varía significativamente en los distintos tejidos vasculares. Su cuerpo celular contiene el núcleo y sólo una pequeña porción de citoplasma que se expande, originando largas prolongaciones que abrazan a las células endoteliales y se extienden generalmente paralelas al eje mayor del capilar (Tilton, 1991). La célula aparece rodeada por una membrana basal. El núcleo heterocromático contiene cromatina condensada periféricamente, observándose ocasionalmente un nucléolo. A pesar del delgado citoplasma celular, el pericito es rico en atributos citoplásmicos: se han observado centriolos cercanos al núcleo (Stensaas, 1975), mitocondrias abundantes, retículo endoplásmico rugoso patente, aparato de Golgi y ribosomas libres evidentes.

Los pericitos se encuentran en estrecha asociación con las células endoteliales, incluso desde los primeros estadios del desarrollo (Simionescu et al., 1988).

La variabilidad en forma, frecuencia y distribución de esta estirpe celular en el lecho vascular, y las diferencias observadas en la relación con la célula endotelial en tejidos de diversa naturaleza, se ha interpretado en términos de pertenencia a una familia celular heterogénea. En cerebro, los pericitos parecen expresar ciertas proteínas que no están presentes en otros capilares (Krause et al., 1988); ello, ha conducido a la

sospecha de funciones específicas en los capilares cerebrales (Risau et al., 1990).

Se han propuesto numerosas funciones para explicar su presencia en íntima asociación con los capilares. En este sentido, se ha sugerido que los pericitos son células pluripotentes, capaces de experimentar mitosis y penetrar en el parénquima cerebral, convirtiéndose en células de la microglia (Kosunen et al., 1963; Maxwell & Kruger, 1965; Mori & Leblond, 1969; Boya, 1976; Peters et al., 1976; Jordan & Tomas, 1988; Graeber et al., 1989). Estas células son capaces de experimentar procesos de contracción celular (Rouget, 1873, 1879; Vimtrup, 1922; Zimmermann, 1923; Bensley & Vimtrup, 1928; Krogh, 1929; Tilton et al., 1979), modulando con ello el flujo sanguíneo vascular. Esta hipótesis se sostiene y corrobora con la localización de moléculas implicadas en procesos de contracción: Ó-actina (Owman et al., 1977; Skalli et al., 1989), tropomiosina (Joyce et al., 1985a), isomiosina (Joyce et al., 1985b).

Se han advertido que los pericitos asociados a los capilares cerebrales, poseen una importante función fagocítica (Maxwell & Kruger, 1965; Cancilla et al., 1972; Kristensson & Olsson, 1973; Wagner et al., 1974; Mato et al., 1980; Sims, 1986). A pesar de la hipótesis defendida por Del Río-Hortega (1917, 1919, 1920), sobre el origen reticuloendotelial (a partir de las células de la microglía) y neuroectodérmico del origen de los macrófagos cerebrales, se ha demostrado que los pericitos cerebrales comparten determinantes antigénicos con macrófagos (Graeber et

al., 1989).

En otro orden, los pericitos mantienen una importante gestión coordinando la función de la célula endotelial. Se han advertido uniones "gaps" funcionales entre los pericitos y las células endoteliales en el S.N.C (Cuevas et al., 1984; Larson et al., 1987), fundamentando la suposición de una coordinación en las funciones de ambos tipos celulares. Diversos autores han propuesto para estas células un importante papel en la regulación de la proliferación de las células endoteliales (Rhodin 1968; Crocker et. al., 1970; Orlidge et al., 1987, 1988; Sato & Rifkin, 1989; Antonelli-Orlidge et al., 1989).

Rhodin (1968) propuso que los pericitos funcionan como soporte mecánico de la pared capilar, basándose en la ubicación anatómica de aquellos, en los contactos con las células endoteliales y en la continuidad existente entre las membranas basales de ambos tipos celulares. En este sentido, Courtoy & Boyles (1983) demostraron la presencia de una proteína de adhesión, la fibronectina, en la interfase pericito-endotelial; demostrando en esta zona, microfilamentos y placas densas.

Los pericitos son capaces de contribuir en la síntesis de la membrana basal capilar (Cohen et al., 1980; Stramm et al., 1987).

Entre otras funciones, se ha sugerido que los pericitos son capaces de modular la permeabilidad (Miller & Sims, 1986; Tagami

et al., 1991) y el flujo sanguíneo capilares (Herman & Jacobson, 1988). Se estima que pueden desempeñar algún papel en la notificación de información a las células endoteliales de la liberación de sustancias desde el tejido nervioso (Rhodin, 1968; Sheridan & Larson, 1982; Cuevas et al., 1984; Larson et al., 1987), jugando algún papel en los procesos de presentación antigénica. Según Bertossi et al. (1991) los pericitos constituyen la principal barrera de permeabilidad en los momentos previos a la maduración de las células endoteliales.

Numerosos estudios han puesto en evidencia la implicación en la alteración de estas células y en enfermedades de diversa naturaleza. En la enfermedad de Tay-Sachs se ha observado una acumulación excesiva de lípidos, tanto en los pericitos como en las células endoteliales (Terry & Weiss, 1963); la acumulación de cuerpos cristaloides en pericitos en el S.N.C. se ha advertido en pacientes que padecen la enfermedad de Krabbe (Shaw & Carlson, 1970; Suzaki & Grover, 1970; Andrews et al., 1971).

La membrana basal de los capilares cerebrales es una estructura trilaminar (Perlmutter et al., 1990a, 1991), semejante a la observada en glomérulos renales (Timpl & Dziadek, 1986). En el desarrollo cerebral temprano, se pueden observar distintas capas de material filamentososo en asociación con las células endoteliales y gliales (Bar & Wolff, 1973). Posteriormente estas láminas se fusionan, formando una estructura aparentemente homogénea, que engrosa durante el desarrollo postnatal (Donahue & Papas, 1964; Bar & Wolff, 1973, 1976).

La membrana basal está constituida por componentes intrínsecos y extrínsecos. Los componentes intrínsecos son el heparán sulfato proteoglicano (HSPG), colágeno tipo IV (CIV) y lamininas (Orkin et al., 1977; Timpl et al., 1979; Hassel et al., 1980; Martínez-Hernández & Amenta, 1983; Garbisa & Negro, 1984; Daniels et al., 1984), y los extrínsecos, las fibronectinas. El colágeno tipo IV conforma la estructura central de la "lámina densa", lugar de unión de las membranas basales endoteliales y astrogliales, (Martínez-Hernández & Amenta, 1983). Las lamininas y el HSPG, se sitúan respectivamente, en las superficies de las membranas basales endotelial ("lámina rara interna") y astrogliar ("lámina rara externa"), (Martínez-Hernández & Amenta, 1983; Garbisa & Negro, 1984).

La lámina basal proporciona soporte físico a los capilares cerebrales, desempeñando, así mismo, un importante papel en los procesos de adhesión celular (Martínez-Hernández & Amenta, 1983; Garbisa & Negro, 1984; Aumailley & Timpl, 1986; Lein et al., 1991) controlando los procesos de migración celular. La lámina actúa de filtro selectivo, e incluso parece proporcionar protección al cerebro, junto con las prolongaciones astrocitarias, ante el posible extravasado de proteínas (Van Deurs, 1976). Se ha señalado, que la membrana basal es capaz de ejercer alguna influencia sobre la función de la célula endotelial (Goldstein & Betz, 1983; Goldstein et al., 1986a). Además, se han demostrado los efectos promotores de la neuritogénesis del HSPG, CIV y las lamininas (Edgar et al., 1984; Lander et al., 1985a, 1985b; Dow et al., 1988; Lein et al.,

1991).

La integridad de la membrana basal resulta esencial para al mantenimiento de la barrera hematoencefálica. En capilares cerebrales humanos se ha observado que con la edad se produce un marcado engrosamiento de la lámina basal (Burn et al., 1979, 1981, 1983), así como en diversos estados patológicos, como en la enfermedad de Alzheimer y en otras encefalopatías de diversa naturaleza (Torack, 1969; Wisniewski et al., 1972; Hughes et al., 1973; Mancardi et al., 1980; Nagy et al., 1983; Fillit et al., 1987; Athanikar et al., 1988; Perlmutter et al., 1990b, 1990c, 1991; Mann et al., 1992). Este engrosamiento, se debe a un aumento en la actividad de la prolinahidroxilasa presente en las células endoteliales, que cataliza la síntesis de la hidroxiprolina, componente exclusivo del colágeno (Ooshima et al., 1975).

A microscopía óptica, una característica especial de los capilares cerebrales es el acoplamiento de las expansiones o prolongaciones gliales a la membrana basal de la pared capilar (Suarez-Nájera et al., 1980; Fernández et al., 1984), de tal modo que, aparentemente el capilar aparece recubierto por citoplasma glial. Se ha sugerido que las propiedades específicas del epitelio endotelial se originan como consecuencia de la actividad de la glía perivascular. Es posible, aunque se desconoce a ciencia cierta, que las células gliales desempeñen un importante papel en el ajuste y regulación de la permeabilidad de los capilares cerebrales (Tagami et al., 1991), por una parte a

través de la interacción con las uniones estrechas interendoteliales y, por otra, mediante el control de las actividades físico-bioquímicas de los componentes de los capilares cerebrales. Estudios previos han señalado el papel de las células gliales en la elaboración de señales capaces de regular la polaridad celular (Debault & Cancilla, 1980; Beck et al., 1984), induciendo la formación y regulando el mantenimiento de las uniones estrechas (Stewart & Wiley, 1981; Tao-Chen et al., 1987, 1988; Arthur et al., 1987). Se desconoce aún el mecanismo por el cual los astrocitos son capaces de inducir la formación de las uniones estrechas; sin embargo, en otros sistemas se han observado que estas uniones pueden proliferar en respuesta a una acción enzimática (Orci et al., 1973; Polak-Charcon et al., 1978), regeneración (Huttner et al., 1985) y otros estímulos hasta ahora desconocidos (Kachar & Pinto da Silva, 1981).

Existen ciertas regiones cerebrales que carecen de mecanismos de barrera. En ellas, las células endoteliales no mantienen entre si uniones estrechas, permitiendo, por consiguiente, el libre intercambio de moléculas entre la sangre y el tejido nervioso (Wislocki & King, 1936; Bradbury, 1979; Risau, 1990). La mayor parte de estas áreas se localizan en: la eminencia media (hipotálamo), la neurohipófisis, los plexos coroideos, la glándula pineal, el órgano subfornical, la lamina terminalis y las regiones dorsocaudales al núcleo del tracto solitario (Leonhardt, 1980; Broadwell et al., 1983; Brightman, 1975; Bouchaud et al., 1989; Shaver et al., 1990; Gross et al., 1990, 1991).



En estas regiones, la exposición directa de ciertas neuronas a la influencia de la circulación sanguínea, resulta de vital importancia funcional. De este modo, las hormonas neuroendocrinas, pueden acceder libremente al torrente circulatorio. Estas neuronas, además, pueden ajustar su actividad mediante mecanismos de retroalimentación ("feedback") en respuesta a los niveles de hormonas circulantes.

El desarrollo de la BHE, su mantenimiento fisiológico y su reparación, resultan procesos complejos y multifacetados (Bradbury, 1979; Cserr et al., 1984; Goldstein et al., 1986a). Se ha observado que la implantación de injertos nerviosos en el parénquima cerebral, puede conducir a alteraciones en las propiedades de la BHE (Jaeger, 1985, 1991; Rosenstein, 1987; Krum et al., 1988; Powell et al., 1990).

Se ha demostrado histológicamente, en estudios postmortem (Winiewski & Kozlowski, 1982; Banks et al., 1991; Constantinidis, 1991; Mecocci et al., 1991; Wallin & Blennow, 1991; Favarato et al., 1992; Mann et al., 1992; Mooradian & Smith, 1992) alteraciones en la permeabilidad de la BHE en individuos afectados por la enfermedad de Alzheimer. El depósito de aluminio que se produce en estos enfermos, se debe a una alteración en la entrada y metabolismo de dicho metal a través de la BHE, (Deloncle et al., 1990). Diversas líneas de investigación han sugerido que una disfunción de la BHE puede resultar importante en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, habiéndose sugerido que esta enfermedad puede ser consecuencia de una

demencia capilar (Scheibel et al., 1984).

En la encefalopatía hepática se ha propuesto también una implicación de la alteración de la permeabilidad al GABA a través de la BHE (Schafer et al., 1982, 1983, 1984; Spatz, 1984; Hoyumpa, 1986). Existen evidencias que relacionan alteraciones de la permeabilidad de la BHE, con estados patológicos de naturaleza diversa como la hipertensión (Spatz, 1984; Magnoni et al., 1989; Nag, 1987b, 1991), diabetes (Schivers, 1979; Stauber et al., 1981; Magnoni et al., 1989), isquemia cerebral (Magnoni et al., 1989, Brust, 1991), situaciones de stress (Gilbert, 1965; Lorenzo et al., 1965; Seyle, 1966; Angel, 1966, 1969; Cutler et al., 1968; Basch et al., 1970; Bondy & Purdy, 1974; Christensen et al., 1981; Belova & Jonsson, 1982; Sharma et al., 1986, 1988, 1991), cerebritis (Lo et al., 1991), etc.

Las observaciones sugieren que la barrera hematoencefálica supone una resistencia funcional regulada de forma dinámica, capaz de controlar el paso de las diversas sustancias entre la sangre y el tejido nervioso, de acuerdo con las demandas fisiológicas. Se ha observado que la permeabilidad de la BHE aumenta tras la estimulación o lesión de neuronas catecolaminérgicas centrales (Rapoport, 1976; Bradbury, 1979).

## 2.- TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA BHE:

El cerebro está separado del resto del cuerpo no sólo espacialmente, sino también bioquímicamente, mediante la formación de una barrera selectiva que permite proteger al Sistema Nervioso de la influencia de los eventos metabólicos generales y de posibles sustancias químicas no deseables o nocivas, permitiendo la extracción de la circulación sanguínea de los nutrientes requeridos.

Numerosas sustancias, que son necesarias para el funcionamiento correcto del cerebro, han de ser transportadas a través de la pared capilar, mediante procesos de transporte activo. La energía necesaria para dicho transporte procede de la fosforilación oxidativa, cuya capacidad está representada en la pared capilar por su abundante contenido mitocondrial.

La BHE regula todos los intercambios que se producen entre el cerebro y la circulación sanguínea, mediante sistemas de transporte y receptores localizados específicamente en las membranas luminal y abluminal. De esta forma, el transporte de sustancias a través de la BHE está determinado primeramente por la liposolubilidad de la sustancia en cuestión y por la presencia de sistemas transportadores (Goldstein & Betz, 1986b; Pardridge et al., 1986a). Por otra parte, el transporte de células está determinado, por la presencia o ausencia de moléculas de adhesión celular (Butcher, 1991), y para virus, por su carga superficial,

la presencia de receptores (Friedmann, 1943; Dropulic & Masters, 1990) y la capacidad de penetrar a través de células infectadas.

Resulta de vital interés el estudio del transporte a través de la BHE, ya que la entrada en el cerebro de muchos agentes neurofarmacológicos está limitada por la BHE. De esta forma, un método que, de forma reversible, permitiera incrementar la permeabilidad cerebrovascular, podría potenciar el tratamiento de diversas enfermedades neurofarmacológicas. Actualmente se utilizan estudios en capilares cerebrales aislados y células endoteliales en cultivo (Dallaire et al., 1991; Durieutrautmann et al., 1991; Takakura et al., 1991; Joó, 1992), así como estudios con trazadores (Xu et al., 1991). Sztrízha & Betz (1991) han observado que la infusión intracarotídea de ácido oleico, conduce a un incremento en la permeabilidad de la BHE de forma reversible y dosis dependiente.

En el cerebro se reconocen dos sistemas de barrera, la barrera hematoencefálica y la hematocefalorraquídea. La mayor parte de los capilares cerebrales, más de un 90%, están implicados en la formación de la barrera hematoencefálica, mientras que la hematocefalorraquídea está constituida por un escaso número de capilares que bañan los plexos coroideos y los órganos circunventriculares (Brightman, 1977). La BHE es, al menos en cuanto a área superficial se refiere, de unas  $5 \cdot 10^3$  veces la hematocefalorraquídea (Crone, 1971). Esta consideración subraya la gran importancia cuantitativa de la BHE, constituyendo la principal limitación al movimiento y al transporte de solutos.

El transporte a través de la BHE implica necesariamente tres pasos: transporte a través de la membrana luminal, la difusión a través de la membrana luminal, la difusión a través de los 0.3-0.5  $\mu\text{m}$  que constituyen el citoplasma endotelial, y el paso a través de la membrana antiluminal de la BHE.

La penetración de sustancias lipofílicas a través de la BHE depende de cuatro factores principalmente (Lefauconnier et al., 1984; Olendorf, 1948): la lipofilia de la forma no disociada, la disociación iónica al pH del plasma (sólo las formas no disociadas son capaces de atravesar la membrana), la unión a proteínas del plasma y el peso molecular.

Se han identificado sistemas de transporte específicos para distintos tipos de nutrientes, (Pardridge, 1983): hexosas, ácidos monocarboxílicos, aminoácidos neutros, aminoácidos básicos, colina, bases púricas y aminoácidos ácidos. Se han demostrado también sistemas transportadores para hormona tiroidea (Pardridge, 1977), vitaminas hidrosolubles como la tiamina (Greenwood et al., 1982), péptidos circulantes de diversa naturaleza (Pardridge, 1985), etc. Estos sistemas de transporte específicos, mediado por receptores presentes en la membrana luminal y antiluminal, constituyen importantes vías en el tráfico de moléculas hidrosolubles entre la sangre y el cerebro. Diversos autores han observado que con la edad se produce una reducción en los procesos de transporte a través de la BHE (Daniel et al., 1978; Samuels et al., 1983; Mooradian et al., 1991).

Así mismo, la BHE es capaz de controlar el pH del microambiente cerebral (Lamberson, 1980).

Los capilares cerebrales son relativamente impermeables al paso de solutos, si se comparan con los de cualquier otro endotelio capilar. Esta impermeabilidad está, sin embargo, al servicio del correcto funcionamiento del S.N.C., permaneciendo este relativamente aislado de los eventos metabólicos generales.

#### 2.a.- Transporte de H<sub>2</sub>O:

Los vasos cerebrales no dejan pasar H<sub>2</sub>O libremente a través de su pared (Raichle & Grubb, 1978). De hecho, presentan una permeabilidad al agua semejante a aquella que poseen las membranas conocidas como "reguladoras de la permeabilidad al agua". Cuando se produce este transporte, se debe a factores hemodinámicos y bioquímicos.

La liberación central de vasopresina incrementa la permeabilidad al agua en los capilares cerebrales (Raichle & Grubb, 1978). Así mismo, la estimulación de la cadena simpática bilateral (Grubb et al., 1977) o del Locus coeruleus (Raichle et al., 1975), también se traduce en un incremento de la permeabilidad al agua, lo cual refleja la importancia de la inervación noradrenérgica en los procesos de regulación de la permeabilidad.

Según Armstrong (1987) tras la apertura osmótica de la BHE, se forman hendiduras de aproximadamente 40 nm en el endotelio, a través de las cuales se puede producir el paso de compuestos hidrosolubles de diverso peso molecular.

Por el contrario, los corticosteroides (Olson et al., 1988), y el péptido natriurético atrial (Doczi et al., 1987), reducen el volumen del flujo de agua a través de la BHE, mediante su actuación sobre receptores específicos (Ibaragi et al., 1988).

#### 2.b.- Transporte de electrolitos:

La ATAsa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , enzima de membrana presente en las células endoteliales de los vasos cerebrales, juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis cerebral de  $\text{H}_2\text{O}$  y electrolitos.

El transporte de  $\text{Na}^+$  tiene probablemente lugar a través de dos sistemas específicos transportadores de  $\text{Na}^+$ , situados en la membrana luminal de la célula endotelial (Joó, 1989), mientras que el transporte dependiente de energía se localiza sólo en la membrana abluminal (Betz, 1983a, 1983b, 1984).

El  $\text{K}^+$  es activamente transportado desde el cerebro a la sangre, a través de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de los capilares cerebrales. Según Goldstein (1979), las células del endotelio cerebral presentan una elevada actividad en el bombeo  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el S.N.C. no está regulada a través de un mecanismo saturable, sensible a cambios agudos en plasma (Tai, 1986). Nag (1988) ha sugerido que este catión es transportado a través de las células endoteliales mediante vesículas de pinocitosis, y que la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa juega un papel muy importante en el transporte transcelular de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 2.c.- Transporte de aminoácidos:

Según Cangiano et al., (1989) el transporte de aminoácidos (aa) no se lleva a cabo gracias al exclusivo trabajo de los transportadores de membrana, presentes en las células endoteliales, sino que, dada la estrecha asociación anatómica entre vasos y astrocitos, ambos componentes celulares cooperan en el proceso de transporte.

El transporte de aa neutros es mediado a través de un pequeño número de sistemas de transporte, denominados sistemas L, A, ASC y GLY (Christensen, 1973). El sistema L prefiere Leucina y grandes aa neutros, es independiente de  $\text{Na}^+$  y es activo en la porción luminal de la célula endotelial (Pardridge, 1975; Toth, 1977). El Sistema A tiene preferencia por Alanina, y opera a través de un sistema dependiente de  $\text{Na}^+$ , activo en la región abluminal de la membrana (Betz, 1978, 1984), polarizado por acción de la glía (Beck et al., 1984). El sistema ASC es específico para Alanina, Serina y Cisteina, mientras que el GLY lo es para Glicina.



En el cerebro el sistema de transporte L es muy activo, mientras que el A es escaso o inexistente (Toth, 1977). El sistema A, puede sin embargo, estar funcionando en la membrana abluminal de la célula endotelial (Betz, 1978), almacenando de esta forma en la propia célula endotelial aa no esenciales como Alanina o Glicina.

Parece sin embargo existir una cooperatividad entre los sistemas de transporte L y A (Cangiano & Cardelli-Cangiano, 1989), en las regiones luminal y abluminal respectivamente.

En cuanto al transporte de aa ácidos, como es el caso de dos neurotransmisores excitadores, ácidos aspártico y glutámico, no resulta clara la presencia de un sistema transportador de baja afinidad en la cara luminal de la membrana (Olendorf, 1976), ya que el cerebro sintetiza dichos aminoácidos. Sin embargo, parece importante la presencia de un sistema de transporte de alta afinidad en la cara abluminal (Hutchinson et al., 1985), dependiente de la concentración y sensible a ouabaína; lo cual indica, que la energía del transporte activo necesaria para la eliminación de glutamato o aspartato, agentes tóxicos causantes de edema cerebral, deriva del acoplamiento del gradiente de Na<sup>+</sup> a través de la membrana endotelial.

#### 2.d.- Transporte de macromoléculas:

Se sabe que la entrada de diversas macromoléculas en el cerebro, transferrina (Fishman et al., 1987) y albúmina (Milici,

1987), se produce a través de mecanismos de transcitosis en el endotelio cerebral. Se ha demostrado que péptidos opiáceos análogos a encefalinas pueden atravesar la barrera hematoencefálica para actuar sobre las actividades cerebrales (Kastin et al., 1991).

La histamina incrementa el transporte transendotelial de albúmina (Dux & Joó, 1982; Boertje et al., 1992) y, al mismo tiempo, el proceso de pinocitosis. La alteración de la permeabilidad de la BHE a albúmina juega un importante papel en la patogénesis del edema cerebral. Parece probable que en circunstancias patológicas, cuando la histamina es liberada desde la sangre circulante (Beaven, 1976), desde terminaciones nerviosas intracerebrales (Takagi, 1986), o desde células cebadas (Dropp, 1972) que se hallan rodeando los capilares, puede incrementarse no sólo el flujo sanguíneo local cerebral, sino también la permeabilidad endotelial (Boertje et al., 1992).

La presencia de receptores histamínicos  $H_2$ , ligados a Adenilato Ciclasa en el endotelio cerebral, ha sido demostrada por Karnushina et al. (1980b) y Joó (1986).

Ha sido demostrada la presencia de las enzimas relacionadas con los nucleótidos cíclicos, AMP y GMP en las células endoteliales cerebrales (Karnushina et al., 1980a; Kobayashi et al., 1981; Schutz et al., 1982). Se ha observado una correlación entre la activación de la adenilato ciclasa en las células endoteliales cerebrales y la inducción del transporte de albúmina

(Adam et al., 1987), observándose un incremento en el número de vesículas de pinocitosis y vesículas forradas (Coated vesicles), características del transporte proteico (Joó, 1971; Joó et al., 1983).

Como muestran los estudios a microscopía electrónica (Joó, 1972; Joó et al., 1983; Noble & Wrathall, 1987), el principal mecanismo en la alteración de la BHE parece ser más la activación del transporte vía pinocitosis en el endotelio cerebral, que el paso interendotelial a través de las uniones estrechas.

Ha sido detectada la fosforilación de proteínas en los capilares cerebrales (Pardridge et al., 1985a; Weber et al., 1987), demostrándose fosforilación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina,  $\text{Ca}^{2+}$ -fosfolípidos, AMPc y GMPc (Olah, 1988). De forma general puede decirse que aquellas proteínas que son fosforiladas en procesos en los que están implicadas proteínas quinasas dependientes de nucleótidos cíclicos, alcanzan su máximo grado de fosforilación muy rápidamente, y se mantienen en tal estado durante más tiempo, que aquellas fosforiladas por enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Joó, 1989). Puede considerarse como hipótesis el hecho de que cuando las células endoteliales son estimuladas por sustancias vasoactivas, liberadas desde plaquetas circulantes o directamente desde el citoplasma endotelial, se produce un incremento en la generación de nucleótidos cíclicos, activándose proteínas quinasas dependientes, y como consecuencia de su actividad, activándose el transporte transendotelial (Joó, 1989).

El incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre observado en las células endoteliales en respuesta a histamina (D'Amore & Shepro, 1977) y bajo condiciones de edema cerebral experimental, producido por ácido kaínico (Sztriha & Joó, 1986), puede activar proteínas quinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, que se ha comprobado es la principal enzima fosforilante de los capilares cerebrales (Olah et al., 1988).

#### 2.e.- Transporte de monosacáridos:

Los monosacáridos atraviesan la BHE a través de un mecanismo de difusión independiente de  $\text{Na}^+$  e insulina. L-glucosa y L-fructosa sólo atraviesan la BHE en tasas muy limitadas (Cunningham, 1986).

La insulina es transportada a través de la BHE mediante un receptor ATPasa-dependiente. Los receptores de insulina de las células endoteliales contienen sólo ácido siálico, siendo por tanto, distintos de los de las neuronas.

#### 2.f.- Transporte de neuropéptidos:

Los neuropéptidos pueden atravesar la BHE mediante receptores estereoespecíficos. La vía de transporte es independiente de ATPasa, es saturable y puede estar mediado por  $\text{Na}^+$  (Bradbury, 1986; Banks & Kastin, 1987).

Los neuropéptidos pueden ejercer su efecto directamente o disparando una señal a través de un segundo mensajero, modulando de este modo la permeabilidad de la BHE (Young et al., 1986).

### 3.- CONTROL NEURAL DEL FLUJO MICROVASCULAR EN EL S.N.C.:

La conexión entre la actividad neuronal y el flujo sanguíneo capilar del S.N.C. es considerado actualmente un hecho real (Lou & Edvinsson, 1989), observándose que dicho flujo puede ser ajustado muy rápidamente a nivel microvascular de acuerdo con las demandas metabólicas específicas, que implican las actividades psíquicas y motoras. Mediante tomografía de emisión de positrones, se ha observado que el aumento del movimiento del brazo y mano se ven acompañados por un aumento en el flujo sanguíneo en la región ipsilateral del cerebelo y en la corteza motora contralateral. También se producen cambios regionales específicos en el flujo sanguíneo, en respuesta a la estimulación visual y el esfuerzo mental. La interpretación más simple de estos hechos está en relación con el incremento de las demandas energéticas que se producen durante el aumento de la actividad nerviosa (Cunningham et al., 1988; Sokoloff, 1988).

La naturaleza de los mecanismos de acoplamiento han estado y están, sujetos a discusión. Originalmente, Roy & Sherrington (1890) sugirieron que los productos metabólicos que se acumulan, como consecuencia de la actividad metabólica neuronal y, que desde las células nerviosas llegan al fluido cerebral extracelular ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}^+$ , adenosina, intermediarios glucolíticos, etc...) actúan como reguladores del tono vascular, como sustancias vasoactivas que son capaces de disminuir la resistencia vascular, y como consecuencia de ello, producir un

incremento del flujo sanguíneo. Sin embargo, diversos investigadores, han observado que el flujo se incrementa en una proporción que es mayor que el incremento del metabolismo (Siver, 1978; Fox & Raichle, 1986) y que, por lo tanto, un simple mecanismo homeostático no resulta suficiente para explicar muchas de las características del mecanismo de acoplamiento. Las observaciones de Paulson & Newman (1987) han sugerido que el  $K^+$ , presente en los puntos de despolarización de los axones intracerebrales, puede actuar sobre los capilares a través de los astrocitos, modificando el flujo capilar.

Aunque generalmente no se considera que los capilares cerebrales estén inervados, existen sin embargo, evidencias sustanciales de que los circuitos neuronales en el S.N.C. pueden influir directamente sobre diversos aspectos de la función cerebral capilar (Rennels & Nelson, 1975; Forbes et al., 1977; McDonald & Rasmussen, 1977; Itakura et al., 1977; Owman & Edvinsson, 1977; Swanson et al., 1977; Reinhard et al., 1979). Si las neuronas del S.N.C. inervan elementos no nerviosos, como es el caso de los capilares cerebrales, podría pensarse en la existencia de un sistema autónomo en el cerebro, capaz de regular la circulación. En este sentido, las neuronas pueden activar los vasos sanguíneos y, de este modo, podría establecerse un mecanismo de acoplamiento entre el metabolismo cerebral y el flujo capilar (Raichle et al., 1975; Lou & Edvinsson, 1989).

La posible acción neurovascular, ha sido puesta en duda por objeciones tales como la ausencia de contactos sinápticos específicos entre axones y vasos.

Estudios a microscopía electrónica evidencian la inervación de los capilares cerebrales (Rennels & Nelson, 1975; Forbes et al., 1977; McDonald & Rasmussen, 1977; Itakura et al., 1977; Swanson et al., 1977; Reinhard et al., 1979), observándose terminaciones axónicas en estrecho contacto con la lámina basal que rodea a los pericitos o a las propias células endoteliales.

Tales observaciones tienen una particular relevancia, si se tiene en cuenta la localización inmunohistoquímica de proteínas contráctiles, tipo actina (Owman et al., 1977; Skalli et al., 1989), tropomiosina (Joyce et al., 1985a) e isomiosina (Joyce et al., 1985b) en las células endoteliales.

La existencia de un control de la permeabilidad capilar, y del flujo sanguíneo local, a través de terminaciones axónicas, es un hecho aceptado actualmente por diversos autores (Hardebo & Owman, 1980; Goldstein & Betz, 1983; Palmer, 1986a; Pardridge, 1988; Palmer et al., 1989).

La inervación de arterias y arteriolas permite modular la resistencia y el flujo sanguíneo cerebral, mientras que la inervación de los capilares permite regular el restablecimiento y el ajuste de las diversas funciones de la BHE.



A pesar de que se acepta que los capilares están inervados por terminaciones axónicas de origen intracerebral, y que la función de los capilares cerebrales está probablemente regulada por las informaciones de origen neuronal, los posibles mecanismos por los que se regula la función capilar no se conocen completamente. Uno de tales mecanismos, parece ser la vía de fosforilación de proteínas del capilar cerebral, actividad que se realiza casi exclusivamente en la membrana plasmática endotelial (Pardridge et al., 1985b), siendo mínima la actividad en el citoplasma endotelial, y existiendo un triplete de proteínas (50-55K) relativamente específicas de los capilares cerebrales.

#### **\*.- Acción de los diversos neuromediadores:**

##### **3.1.- Catecolaminas:**

La localización inmunohistoquímica de DA- $\beta$ -hidroxilasa ha demostrado la existencia de terminaciones axónicas noradrenérgicas estrechamente asociadas a los vasos cerebrales. Ello ha permitido sugerir la existencia de una función de carácter autónomo de las neuronas origen de dichos axones. Esta estrecha asociación entre axones noradrenérgicos y los capilares ha sido confirmada a microscopía electrónica (Hartman, 1989).

La presencia de terminaciones nerviosas adrenérgicas, que tienen su origen en el Locus coeruleus (Hartman, 1973; Swanson

et al., 1977; Rennels & Nelson, 1975) sobre vasos, fue confirmada por Hartman (1973). Posteriormente diversos autores (Raichle et al., 1978; Hartman et al., 1980; Preskorn et al., 1982), han indicado el control adrenérgico sobre la permeabilidad capilar a pequeñas moléculas y al agua a través de mecanismos que generan AMPc como segundo mensajero intracelular (Joó et al., 1975).

Friedman & Davis (1980), Harik et al. (1980, 1981), Peroutka et al. (1980), Herbs et al. (1979), Kobayashi et al. (1981a, 1981b), Nathanson (1979, 1980), Culvenor & Jarrot (1981), Palmer (1978, 1979), Baca & Palmer (1978), Huang & Drummond (1979) y Herbst et al. (1979) han demostrado la presencia de receptores adrenérgicos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) en los capilares.

Existen diversas evidencias fisiológicas y farmacológicas, en favor de la modificación de la función vascular por acción catecolaminérgica (Hartman, 1989):

- 1.- La administración de carbamil-colina, estimulante de la actividad del Locus coeruleus, conduce a una rápida alteración de la BHE, a nivel de flujo sanguíneo cerebral y permeabilidad capilar al agua.

- 2.- La administración intraventricular de antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos (pentolamina) revierte los efectos anteriores.

- 3.- La estimulación eléctrica del Locus coeruleus produce efectos similares a la administración de carbamil-colina.

- 4.- Los antidepresivos tricíclicos, a través de una inhibición de la recaptación sináptica de catecolaminas, producen

efectos similares a la administración de carbamil-colina.

5.- Los antagonistas adrenérgicos, así como la 6-OH-dopamina, bloquean la acción de los antidepresivos tricíclicos.

Diversas investigaciones han indicado que la permeabilidad de los capilares intracerebrales a pequeñas moléculas y al  $H_2O$ , está bajo control catecolaminérgico (Hartman et al., 1980; Prescorn et al., 1980). Tal control está acoplado a mecanismos en los que interviene el AMPc, a través de la activación de la Adenilato ciclasa.

La estimulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, y del sistema de AMPc acoplado, ejerce un papel modulador sobre los procesos metabólicos de las células del endotelio cerebral, a través de la interacción con sistemas de proteínas quinasas (Joó et al., 1988), pudiendo con ello facilitar la contracción de moléculas tipo actina presentes en la célula endotelial (Owman et al., 1977). Esta contracción podría conducir a la separación de las células endoteliales, a nivel de las uniones estrechas.

La acción de las catecolaminas sobre el flujo sanguíneo cerebral varía dependiendo de que tal suceso sea ejercido a través de receptores  $\alpha$  o  $\beta$ . A través de los receptores de tipo  $\alpha$  se produce una vasoconstricción, mientras que a través de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos la acción media una vasodilatación (Edvinsson, 1982).

Por ello, se ha sugerido que la acción noradrenérgica sobre

el flujo capilar en los diversos centros nerviosos debe estar en relación con el predominio de una u otra clase de adrenorreceptores presentes en los vasos sanguíneos en tales centros.

### 3.2.- Dopamina:

Aún no se sabe con certeza, si terminaciones nerviosas dopaminérgicas están relacionadas con capilares en todo el S.N.C. Sí, se ha demostrado la existencia de dichas terminaciones sobre la pared de los capilares en neocórtex (Braun et al., 1980; Sharkey & McCulloch, 1985a, 1985b), incrementando el flujo sanguíneo en dicha región.

Los estudios farmacológicos (Baca & Palmer, 1978; Palmer, 1981a, 1981b; Karnushina, 1982) han demostrado que la dopamina estimula la actividad de la Adenilato ciclasa en la pared de los capilares cultivados de distintos centros nerviosos, pero no los de cerebelo.

La utilización de técnicas de radioligandos reveló la existencia de receptores dopaminérgicos  $D_2$ , acoplados negativamente a Adenilato ciclasa, no pudiendo ser demostrados los receptores  $D_1$ , acoplados positivamente a esta enzima en la pared capilar (Baca & Palmer, 1978; Palmer et al., 1978, 1979, 1989; Nathanson & Glaser, 1979; Peroutka et al., 1980).

El hecho de que en ratas hipertensas se haya observado una reducida sensibilidad a dopamina, tanto en el tejido cerebral como en los capilares (Palmer, 1979), debido a la desensibilización de los receptores en base a los niveles anormalmente altos de dopamina (Versteeg et al., 1976), junto con el hecho de que cuando se inyectan anfetaminas, agentes liberadores de dopamina, se produce un incremento en la permeabilidad de la BHE, efecto inhibido por los neurolépticos (Braun et al., 1980), sugiere que la dopamina puede jugar un papel muy importante en el control de la permeabilidad de sustancias desde la sangre al cerebro.

### 3.3.- Serotonina:

Al igual que las catecolaminas, la serotonina puede tener efectos vasoconstrictores o vasodilatadores sobre los vasos cerebrales, (Harper & Mackenzie, 1977; Reinhard et al., 1979; Gaw et al., 1990; Dabire & Richer, 1991).

Normalmente la 5-HT produce la contracción de los vasos, a través de receptores 5HT<sub>1</sub> y 5HT<sub>2</sub> (Gaw et al., 1990); sin embargo, a altas dosis, o en presencia de trauma o isquemia, la 5-HT puede dilatar los vasos cerebrales indirectamente, a través de la liberación de NE (Edvinsson & Mackenzie, 1977; Marin et al., 1979), o a través de la liberación de EDRF (factor relajante derivado del endotelio) (Cocks & Angus, 1983; Gaw et al., 1990).

Los capilares cerebrales, así como los vasos piales y los de los plexos coroideos, reciben inervación serotoninérgica vía núcleo del Rafe (Reinhard et al., 1979; Edvinsson et al., 1980).

Aunque Reinhard (1979) describió receptores para serotonina en los capilares cerebrales, otros autores mantienen la controversia no habiendo observado actividad Adenilato ciclasa sensible a 5-HT en capilares aislados y cultivos de endotelio (Baca & Palmer, 1978; Karnushina et al., 1982; Huang & Rorstad, 1983).

La serotonina es uno de los compuestos neuroquímicos implicados en diversas situaciones de stress y enfermedades neurológicas (Aghajanian, 1978; Essman, 1978; Pappius et al., 1988; Wahl et al., 1988; Kitayama et al., 1989; Schweiger et al., 1989). La infusión de serotonina incrementa la permeabilidad de la BHE (Sharma et al., 1990).

#### **3.4.- Histamina:**

En diferentes regiones cerebrales, excepto en cerebelo, se han observado receptores histaminicos  $H_1$  y  $H_2$ . En capilares cerebrales de cobaya y rata se ha observado activación de la Adenilato ciclasa a través de receptores  $H_2$  (Huang & Drummond, 1979; Karnushina et al., 1980; Boertje et al., 1992).

La histamina incrementa la permeabilidad de la BHE (Gross et al., 1981, Boertje et al., 1992) sin modificar la estructura

de las uniones endoteliales. Según los estudios bioquímicos y de microscopía electrónica (Joó, 1989), la histamina resulta ser un potente activador de la pinocitosis y del transporte de albúmina a través de receptores  $H_2$  acoplados a Adenilato ciclase (Joó et al., 1975; Huang & Drummond, 1979; Peroutka et al., 1980; Karnushina, 1980; Dux & Joó, 1982). La histamina incrementa significativamente el número de vesículas de pinocitosis libres en el citoplasma, las vesículas forradas (Coated vesicles) y el de vesículas de pinocitosis unidas a la lámina basal (Dux & Joó, 1982). Los nucleótidos cíclicos producidos parecen intervenir en la fosforilación de proteínas específicas del endotelio, algunas de las cuales pueden estar relacionadas con el esqueleto contráctil endotelial (Joó, 1989).

Los agentes bloqueadores de los receptores  $H_2$  son capaces de impedir la formación de edema cerebral en modelos experimentales (Joó et al., 1976; Sztrihai et al., 1987; Dux et al., 1987).

Se ha observado que en capilares cerebrales, las actividades de la histamina decarboxilasa y la histamina-N-metiltransferasa, enzimas implicadas en la síntesis y metabolismo de histamina, son muy bajas. La histamina no parece ser sintetizada en los propios capilares cerebrales, sino que esta es liberada desde neuronas histaminérgicas (Joó et al., 1981), mastocitos (Dropp, 1972) o sangre circulante (Beaven, 1976) y captado secundariamente por los capilares cerebrales.

La histamina estimula la síntesis de una gran variedad de prostanoides en los capilares cerebrales normales. Las prostaglandinas de la serie E y las prostaciclinas, activan la adenilato ciclasa en los capilares del cerebro (Huang & Drummond, 1979; Karnushina et al., 1982; Huang & Rorstad, 1983; Spatz, 1986).

En los vasos cerebrales han sido observados receptores para prostaciclinas (Huang & Drummond, 1979).

### 3.5.- GABA:

Han sido detectados receptores para GABA en el endotelio cerebral de bovinos (Krause et al., 1980) y cerdo (Rausch et al., 1983).

Los resultados observados en relación con el efecto del GABA sobre los capilares, es contradictorio. Edvinsson et al. (1980, 1985a), Alborch et al. (1984) y Palmer (1986), han demostrado un incremento en el flujo sanguíneo tras su administración. Sin embargo, Kelly & McCulloch (1983) observaron una disminución proporcional del flujo sanguíneo y de la utilización de glucosa.

Se considera que estos resultados discrepantes pueden ser debidos a diferencias en el contenido de receptores en las diversas regiones del S.N.C. (Lou & Edvinsson, 1989).



### 3.6.- Hormona paratiroidea (PTH):

Huang & Rorstad (1983) revelaron la existencia de receptores para PTH en el endotelio cerebral. La PTH activa la Adenilato ciclasa en capilares aislados de rata, cobaya, bovinos y porcino (Huang et al., 1983; Huang & Rorstad, 1984).

La PTH induce la relajación de los vasos cerebrales mediante un proceso que parece estar mediado por AMPc (Suzuki et al., 1983).

### 3.7.- Péptidos neuroactivos:

Según Edvinsson et al. (1985b) y Eckenstein & Baughman (1984), existe una red perivascular de fibras nerviosas colinérgicas, que también contienen VIP, originadas principalmente en las capas II y III de la corteza cerebral. Existen evidencias acerca de que tales fibras inervan los capilares cerebrales.

Según Yaksh et al. (1987) el VIP participa directamente en el acoplamiento entre el flujo sanguíneo local y la actividad neuronal. En respuesta a VIP se produce un incremento en el flujo cerebral a través de una vasodilatación (Hanko et al., 1982; McCulloch et al., 1989).

Huang & Rorstad (1983) han descrito receptores de VIP en los capilares cerebrales. El VIP es capaz de estimular la producción de AMPc y GMPc en los capilares (Palmer et al., 1989), induciendo una potente vasodilatación (Suzuki et al., 1983).

Se han identificado en arterias y arteriolas del cerebro de gato, fibras varicosas que contienen CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina). Estas fibras proceden de neuronas cuyos somas se sitúan en el ganglio del trigémino, y en ellas existe colocalización con sustancia P y Neurokinina-A.

La administración exógena de CGRP actúa como el más potente agente relajante de las arterias cerebrales (McCulloch et al., 1986; Edvinsson et al., 1987, 1988).

La acción del CGRP se produce a través de una marcada estimulación del AMPc, mientras que la sustancia P no produce la formación de AMPc, y su capacidad para dilatar los vasos cerebrales requiere aparentemente del denominado factor relajante endotelial (Edvinsson et al., 1985b).

La angiotensina actúa sobre los capilares incrementando la actividad pinocítica en el endotelio cerebral (Nag et al., 1979) y la permeabilidad al agua (Grubb & Raichle, 1981). Este péptido se liga con alta afinidad a los capilares del cerebro de perro (Speth & Harik, 1985), actuando como vasoconstrictor (Wei et al., 1978). No tiene acción (Huang & Rorstad, 1983) o inhibe (Karnushina et al., 1982) la formación de AMPc.

El neuropéptido Y tiene una acción constrictora de los vasos cerebrales, inhibiendo la actividad de la Adenilato ciclasa (Fredholm et al., 1985).

La arginina vasopresina (AVP) es un péptido neurotransmisor que puede alterar la permeabilidad de los capilares cerebrales a nutrientes (Brust, 1986; Ermisch et al., 1982; Reith et al., 1987) y agua (Doczi et al., 1982; Raichle & Grubb, 1978; Grubb & Raichle, 1981).

Se ha demostrado, mediante métodos inmunohistoquímicos la innervación de capilares cerebrales por fibras inmunoreactivas a AVP (Jojart et al., 1984). Los estudios de Perlmutter et al. (1988) han evidenciado la presencia en los vasos cerebrales de una única población de receptores de AVP, denominados receptores  $V_1$ , no ligados a AMPC (Karnushina et al., 1982), sino a la producción de fosfoinosítidos, habiéndose demostrado la presencia en vasos cerebrales de Diacilglicerol-lipasa y actividades quinasas dependientes (Hee-Cheong et al., 1985).

Según Pearlmutter et al. (1988) no parece probable que los receptores para AVP estén restringidos a capilares de una región cerebral determinada, ya que los efectos de la AVP sobre la permeabilidad y el flujo cerebral son difusos (Brust, 1986; Hansen et al., 1987; Reith et al., 1987).

La somatostatina (SRIF) es un péptido neurotransmisor que puede interaccionar con los capilares cerebrales tras su

neurosecreción. SRIF conduce a la vasoconstricción de los vasos cerebrales (Hanko et al., 1982; Long et al., 1992). Se ha observado que la somatostatina se une de forma rápida e inespecífica al exterior de los capilares cerebrales (Pardridge & Yamada, 1985a), sirviendo como mecanismo de rápida eliminación de este neuropéptido del espacio intersticial cerebral tras su neuroliberación. Esta unión puede además hacer accesible el compuesto a peptidasas endoteliales (aminopeptidasa y endopeptidasa) que aseguren su degradación (Pardridge & Yamada, 1985a).

Se ha observado, así mismo, interacción de SRIF con el citoesqueleto de los capilares, lo cual ha conducido a pensar su relación con cambios en la permeabilidad de la BHE (Pardridge & Yamada, 1985a; Long et al., 1992).

### **3.8.- Acetilcolina:**

La presencia de receptores colinérgicos de tipo muscarínico en los vasos sanguíneos cerebrales, fue descrita por Grammas (1983). La acetilcolina incrementa el flujo sanguíneo cerebral, acompañando a una elevación del metabolismo neuronal (Pearce, 1981).

Estos hechos, junto con las observaciones de Iadecola et al. (1985), han conducido a considerar que existe un sistema neuronal colinérgico intrínseco, que es capaz de influir en el flujo

vascular. Como este sistema es multisináptico, puede presentar diversas funciones: puede, por una parte, controlar y regular el flujo sanguíneo en el tronco cerebral en los diferentes estados de vigilia y sueño y afectando a todo el cerebro, y en segundo término, ejercer un mecanismo de control que asegure el acoplamiento entre la función y el flujo sanguíneo a nivel local.

La acetilcolin transferasa (ChAT; EC 2.3.1.6) cataliza la síntesis de acetilcolina en neuronas colinérgicas, identificadas como tales por la presencia de la enzima (Tucek, 1967; Fonum, 1970). Sin embargo, la enzima ha sido detectada también en tejidos no nerviosos, en los que su papel funcional es incierto (Sastry & Sadavongvivad, 1979). Entre estos últimos, se ha observado ChAT en vasos cerebrales de conejo, rata y buey (Goldstein et al., 1975; Duckles, 1982; Estrada et al., 1983; Parnavelas et al., 1985; Santos-Benito & González, 1985), en los que podría estar relacionada con el transporte de aminoácidos a través del endotelio (Parnavelas et al., 1985; Defeudis, 1986), por ejemplo como respuesta vasodilatadora a estímulos nocivos (González & Santos-Benito, 1987).

### **3.9.- Purinas:**

El papel de la adenosina y del ATP, como neurotransmisores o neuromoduladores en el S.N.C. ha sido extensamente estudiado (Burstock, 1977; Phillis & Wu, 1981). Los axones purinérgicos contienen vesículas grandes y opacas, semejantes a las que

contienen péptidos. El ATP contenido en las vesículas sinápticas, actúa sobre receptores específicos en la membrana postsináptica.

El ATP se rompe fácilmente, originándose adenosina, que puede ser recaptada por la propia terminación nerviosa, o destruida por acción de una adenosina desaminasa, tras actuar sobre receptores específicos.

Han sido descritos receptores purinérgicos  $P_1$  y  $P_2$ , de forma que la adenosina actúa a través de su unión a receptores  $P_1$ , y el ATP a través de los  $P_2$ . La adenosina media procesos de fuerte vasodilatación en cerebro (Win et al., 1981). Huang & Drumond (1979), Herbst et al. (1979) y Edvinsson & Fredholm (1983) describieron en los capilares cerebrales la existencia de receptores para adenosina, uniéndose específicamente a receptores de tipo  $A_2$  presentes en los capilares (Huang & Drumon, 1979; Schutz et al., 1982; Kalaria & Harik, 1988), produciéndose una activación la Adenilato ciclase (Huang & Drumond, 1979; Palmer & Ghai, 1982; Schutz et al., 1982), con una potencia comparable a su capacidad de producir relajación (Edvinsson & Fredholm, 1983).

Tanto neuronas como astrocitos, son capaces de almacenar adenosina (Bender & Hertz, 1986), siendo la acumulación más intensa en las células gliales. En ambos tipos celulares, el metabolismo posterior es diferente (Matz & Hertz, 1989): los astrocitos convierten la adenosina principalmente en ATP, ADP y AMP, mientras que las neuronas forman compuestos desaminados

(inosina, hipoxantina).

Por otra parte, tanto astrocitos como neuronas, son capaces de liberar adenosina, lo cual ha sugerido la posibilidad de que la adenosina liberada desde los astrocitos, pueda ejercer un efecto vasodilatador sobre los capilares cerebrales. Receptores para adenosina,  $A_1$  y  $A_2$ , han sido descritos en astrocitos cultivados (Murphy & Peane, 1987). La liberación de ATP o adenosina puede ocurrir no sólo desde axones, sino también desde dendritas y pericarion neuronales, en territorios en los que estas estructuras y la pared capilar cerebral entrán en contacto muy estrecho.

Las terminaciones axónicas que contienen ATP o adenosina, pueden liberar también otras sustancias neurotransmisoras. La posibilidad de que una misma terminación nerviosa pueda liberar distintos neurotransmisores, es ampliamente aceptada hoy en día.

Todos los hallazgos expuestos parecen indicar que existe certeza de que el flujo sanguíneo de los capilares cerebrales, en determinados territorios del S.N.C., deba adaptarse a las necesidades metabólicas de los mismos, ya que dichas demandas están condicionadas por la actividad específica del tejido nervioso. Se piensa que dicha adaptación se realiza en gran medida por la acción que diversas estructuras neuronales y gliales, y mediante neurotransmisores, neurohormonas y

neuromoduladores, iones y otros diversos metabolitos, sobre la pared de los capilares del S.N.C.

Ciertos investigadores han sugerido que el flujo de los capilares debe estar condicionado por la íntima relación morfológica y funcional existente entre las estructuras nerviosas y los diversos componentes que forman parte de la barrera hematoencefálica.

De un modo evidente se ha observado que diversos neurotransmisores, neurohormonas y neuromoduladores, ejercen cierta influencia sobre el flujo vascular y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. También se ha demostrado que diversos receptores para esas sustancias están presentes en la pared de los capilares del S.N.C. Sin embargo, junto a ello, existen escasas observaciones que demuestran una relación morfológica directa e íntima entre las estructuras nerviosas y la pared de los vasos sanguíneos cerebrales.

Las investigaciones morfológicas realizadas hasta el momento se han caracterizado por su falta de sistematicidad. Creemos por ello necesario llevar a cabo una investigación más exhaustiva, realizando estudios morfológicos comparativos de la relación entre las estructuras nerviosas, provistas de determinados neuromediadores, neurotransmisores y neuromoduladores en los capilares de la corteza cerebelosa de rata, en condiciones normales.



#### 4.- FILOGENIA DE LA BHE:

Entre los invertebrados el rango de variación, en términos de permeabilidad de la interfase sangre-cerebro, es muy amplio.

Muchos grupos, entre los que se encuentran anélidos, moluscos inferiores (bivalvos y gasterópodos) y artrópodos primitivos (Límulos y garrapatas), carecen de barrera (Abbott & Treherme, 1972; Binnington & Lane, 1980; Harrison & Lane, 1981). Sin embargo, ciertos grupos de artrópodos, como es el caso de los insectos, presentan mecanismos de barrera que resultan tan efectivos, que las actividades centrales resultan relativamente insensibles a las variaciones prolongadas de las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  del medio, (Treherne & Pichon, 1972; Schofield et al., 1984). En los insectos, la barrera está constituida por las uniones estrechas entre las células gliales perineurales. También se han observado barreras gliales en otros grupos de arácnidos (Lane, 1981).

Los crustáceos decápodos presentan una barrera entre el S.N.C. y la cavidad hemocélica, por consiguiente, alrededor de los nervios periféricos (Abbott et al., 1975); sin embargo, la interfase entre los vasos sanguíneos intracerebrales y el cerebro, es aparentemente permeable a moléculas tan grandes como la insulina y la ferritina (Abbott et al., 1977).

La presencia de un sistema de barrera, sólo en aquellos grupos de invertebrados en los que el S.N.C. está implicado en funciones complejas - presencia de modelos de discriminación visual, control motor, comportamiento social, aprendizaje y memoria - ha conducido a pensar que la barrera resulta imprescindible cuando el nivel de actividad integradora en el tejido nervioso, alcanza un grado suficientemente sofisticado (Abbott et al., 1986).

La BHE está presente en todos los vertebrados (Brightman et al., 1970, Pardridge, 1991). En la mayoría de los mismos, (Ciclóstomos, Teleósteos, Anfibios, Reptiles, Aves y Mamíferos), la barrera está constituida principalmente por las uniones estrechas entre las células del endotelio capilar (Brightman & Reese, 1969; Crone et al., 1982; Cserr et al., 1984).

Los Elasmobranquios presentan un sistema de barrera especial, localizada a nivel de las células de la glía perivascular (Brightman et al., 1969, 1971; Bundgaard & Cserr, 1981, 1984).

La dicotomía entre la barrera glial, presente en algunos invertebrados, y la endotelial, existente en los vertebrados, es más aparente que real. En el S.N.C. de los mamíferos, las células gliales actúan también en la formación de la barrera.

La presencia de barreras gliales, en grupos de animales tan ampliamente diferentes (Mamíferos, Elasmobranquios, Artrópodos,

Moluscos, etc...), sugiere que se trata de una característica glial primitiva. Según Abbott et al. (1986), la primitiva BHE era una barrera de naturaleza glial.

En la mayor parte de los invertebrados, el endotelio no desarrolla suficiente coherencia y organización para funcionar como una barrera, en cuyo caso, cuando esta es necesaria, ha de ser de naturaleza glial.

## 5.- EMBRIOLOGIA DE LA BHE:

Existen dos posibles vías por las que las células endoteliales se pueden diferenciar para constituir la barrera hematoencefálica. En primer lugar, precursores de células endoteliales (angioblastos) predeterminados, derivados del neuroectodermo, podrían diferenciarse para constituir el endotelio de la BHE. Una segunda posibilidad se establece pensando que células endoteliales de origen externo al S.N.C., podrían invadir el neuroectodermo y diferenciarse en respuesta al microambiente neural.

Existen evidencias que apoyan esta última hipótesis: las células endoteliales de los capilares cerebrales no derivan del neuroectodermo, sino que se originan a partir de vasos sanguíneos extraneurales que invaden el tejido nervioso durante su vascularización (Stewart et al., 1981; Risau et al., 1986a, 1986b). Ello se demuestra en base a que la angiogénesis puede ser inducida en transplantes ectópicos de tejido cerebral embrionario (Feeney et al., 1946; Bär, 1980).

Durante el desarrollo embrionario temprano, los angioblastos invaden la región de la cabeza y constituyen el denominado "plexo vascular perineural", que finalmente cubre el tubo neural. A partir de este plexo vascular, se originan brotes vasculares que invaden radialmente el neuroectodermo (Feeney et al., 1946; Bär,

1980; Risau, 1987, 1989). En las aves este proceso tiene lugar alrededor del undécimo día del desarrollo embrionario (Bär, 1980), en conejo en el undécimo día (Donahue, 1964) y en rata en el decimosexto (E16) (Robertson et al., 1985). Posteriormente, en las capas subependimales se produce una ramificación (Risau et al., 1991).

La formación de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes en el cerebro, proceso denominado "angiogénesis", parece estar regulado por factores solubles producidos por el cerebro embrionario, semejantes al factor ácido de crecimiento de fibroblastos (AFGF o Heparin binding growth factor) (Risau et al., 1988b; Folkman & Klagsbrun, 1987; Lyons et al., 1991). El denominado VPF (Factor de permeabilidad vascular) es una glicoproteína (40kD) que incrementa la permeabilidad vascular, el crecimiento de la célula endotelial y potencia la angiogénesis (Keck et al., 1989).

La angiogénesis es un proceso que no ocurre de forma normal en individuos adultos, la renovación de las células endoteliales de los individuos adultos es muy bajo, en humanos es del orden de años. La angiogénesis normal es un proceso estrechamente regulado, sin embargo, en ciertas condiciones patológicas las células endoteliales pueden proliferar rápidamente.

La diferenciación de la BHE es un proceso independiente de la proliferación endotelial: en rata, las células endoteliales comienzan la formación de la barrera en el estadio embrionario

E16 y, sin embargo, siguen proliferando y alcanzan el máximo de actividad entre los días postnatales 5 y 9 (Robertson et al., 1985).

La transición entre los capilares permeables y aquellos que exhiben las características propias de la BHE, se produce a través de diversos cambios en la morfología, bioquímica y función de las células endoteliales, que conducen a la formación de células diferentes de las de cualquier otro endotelio capilar del cuerpo. En el hombre la BHE aparece ya en el tercer trimestre de la vida fetal (Mollgaard, 1975).

Según Stewart et al. (1987) la BHE está escasamente desarrollada en el nacimiento, en la mayoría de los animales; sin embargo, la permeabilidad de la BHE en los individuos jóvenes no puede considerarse como menos selectiva que en el adulto. A pesar de que resulta ser más permeable a algunos solutos, resulta serlo menos a otros (Lefauconnier et al., 1984), lo cual refleja probablemente las diferencias en los requerimientos metabólicos de los cerebros inmaduros y adultos.

El análisis de la permeabilidad de la BHE usando trazadores inertes (HRP), revela que los capilares se hacen gradualmente impermeables durante el desarrollo embrionario, no de manera simultánea. El momento preciso depende de la localización anatómica de estos: en la espina dorsal, se constituyen antes que en el telencéfalo (Wakai et al., 1978).

Las células extraneurales invaden el cerebro, probablemente estimuladas por factores angiogénicos de origen cerebral. La migración, proliferación, formación de la lámina basal y diferenciación de pericitos, ocurre probablemente de forma simultánea durante la angiogénesis. Cuando los astrocitos se diferencian, emiten prolongaciones vasculares, y probablemente inducen en las células endoteliales la diferenciación de la BHE (Risau et al., 1990).

## 6.- CONSIDERACIONES HISTORICAS:

Los primeros estudios que revelaron la presencia de una barrera entre la sangre y el cerebro, se deben al bacteriólogo Alemán Paul Ehrlich (1885), quien observó que la inyección intravenosa de cierto colorante vital provocaba la tinción de tejidos y órganos periféricos, pero no la de cerebro (Lee, 1971). Ehrlich interpretó los resultados suponiendo que el cerebro poseía menos afinidad por el colorante que el resto de los tejidos. Las primeras observaciones de Ehrlich no fueron interpretadas en el contexto de un modelo de barrera.

Briedl & Kraus (1898) observaron que el cerebro y la médula espinal permanecían sin teñir por los ácidos biliares en los pacientes con ictericia. Los ácidos biliares, que no son neurotóxicos cuando se inyectan intravenosamente, producían sin embargo, ataques nerviosos y coma, cuando eran inyectados directamente en cerebro. Dos años después, Lewandowsky, obtuvo un resultado similar, utilizando ferrocianuro sódico.

Al explicar estos descubrimientos, Briedl & Kraus y Lewandowsky, demostraron su notable intuición atribuyendo sus resultados a las propiedades especiales de los pequeños vasos sanguíneos presentes en el cerebro.

Fue Edwin G. Goldmann, discípulo de Ehrlich, quien en 1909 y 1913 demostró el error en la interpretación de resultados de



su maestro, en base a un clásico experimento. Goldman repitió los experimentos de Ehrlich, y observó que el colorante azul trípano no producía la tinción del S.N.C. tras su administración sistémica. Sin embargo, Goldman incluyó entre sus experimentos una experiencia control de gran trascendencia para el conocimiento de la BHE, en la que inyectó el colorante vital ácido, directamente en el sistema ventricular del cerebro de conejos y perros, mostrando con ello, que el cerebro sí era capaz de secuestrar el colorante vital, provocando la tinción del cerebro y no de órganos periféricos.

Goldman formuló la hipótesis acerca de la existencia de una barrera hematoencefálica ("Blunt-Gehrin-Schranke"), en base a sus experimentos.

A pesar de que las experiencias e interpretaciones de Goldman fueron aceptadas con aparente rapidez, la localización de la BHE fue caracterizada erróneamente. Se pensaba que el flujo de nutrientes entre la sangre y el cerebro se producía a nivel de los plexos coroideos.

Pronto, los investigadores observaron que los capilares cerebrales poseían características únicas que los diferenciaban de los vasos de otros órganos (Schaltenbrand & Bailey, 1928). La presencia de la envoltorio glial, que rodea a las células del endotelio cerebral, dio lugar a la controversia acerca de la ubicación de la BHE: si procedía esta de las características únicas de las células endoteliales o de las células gliales.

T. Broman (1941), en una revisión sobre la literatura existente, llegó a las siguientes conclusiones: la BHE, en primer lugar, se localiza a nivel de los capilares cerebrales, de forma claramente distinguible de la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo. En segundo lugar, que la BHE está constituida por el propio endotelio cerebral, y no por las células gliales.

La importancia de los capilares en la aportación de nutrientes y en el intercambio iónico, fue considerada como parte importante de dicha barrera. Fue A. Krogh, quien en 1945, definió las características básicas de la barrera hematoencefálica, características que aún son aceptadas en la actualidad.

Las bases ultraestructurales de la barrera fueron establecidas por Reese & Karnovsky (1967) y Brightman & Reese (1969), quienes observaron que en los capilares cerebrales de rata, la barrera de permeabilidad se localizaba a nivel de las uniones estrechas entre las células endoteliales del cerebro.

A pesar de que la barrera sangre-CSF juega un importante papel en el transporte de ciertos nutrientes (Spector et al., 1982), vitaminas (Spector et al., 1977) y proteínas (Saunders, 1977; Pardridge, 1983), resulta evidente, dada la importancia cuantitativa de la barrera hematoencefálica, que los capilares cerebrales que la constituyen, forman la principal barrera de difusión entre la sangre y el cerebro. Las uniones estrechas entre las células endoteliales, la escasez de vesículas de pinocitosis o fenestraciones en el endotelio cerebral y la

polaridad de la célula endotelial, son las principales características anatómicas y funcionales que subyacen al fenómeno de la BHE.

Las células gliales interaccionan con el endotelio cerebral, pero estas células no constituyen la principal base anatómica de la BHE (Brightman, 1977).

## 7.- ORGANIZACION MORFOFUNCIONAL DEL CEREBELO:

El cerebelo es uno de los centros nerviosos mejor conocidos, tanto morfológica como funcionalmente. Desde las primeras investigaciones de Ramón y Cajal (1888, 1898, 1909, 1911, 1912), hasta los estudios ultraestructurales (Palay & Chan-Palay, 1975) y electrofisiológicos (Eccles et al., 1967) se ha podido discernir que el cerebelo es un centro nervioso provisto de una organización anatómica típica, cuyos componentes desarrollan funciones muy especializadas. Implicado en la regulación de la conducta motora, el cerebelo desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la estática y la coordinación de movimientos (Brooks & Thach, 1981). Está directamente relacionado con las actividades de la médula, del tronco cerebral y del neocórtex, a través de dos grandes circuitos: el cortico-cerebelo-cortical, que controla las regiones motoras de la corteza cerebral a partir de informaciones nerviosas procedentes de la misma; y el médulo-bulbo-cerebelomedular, que ejerce su influencia sobre las motoneuronas de la médula.

El cerebelo está constituido por una porción media, el vermis, flanqueado por dos estructuras laterales simétricas, los hemisferios cerebelosos. Su superficie es estriada por la presencia de surcos transversales que la segmentan en lóbulos (anterior, posterior y floculonodular) y lobulillos.

El cerebelo puede dividirse histológicamente en tres partes diferenciadas: corteza cerebelosa, sustancia blanca y núcleos cerebelosos centrales (fastigial, globoso, emboliforme y dentado). La corteza cerebelosa forma una serie de circunvoluciones profundas, sostenidas por una médula central ramificada de sustancia blanca, en cuyo seno se hallan embutidos los núcleos cerebelosos.

La corteza cerebelosa presenta una estructura trilaminar, cuya organización es histológicamente uniforme en todas las regiones del cerebelo. Está constituida por tres capas, que desde la sustancia blanca hacia la superficie pial externa son: capa granular, la de las células de Purkinje y la capa molecular.

La capa granular tiene un espesor que varía entre 100 -500  $\mu\text{m}$ . El principal tipo celular de esta capa es la célula grano, cuyos axones se dirigen hacia la capa molecular donde se bifurcan, constituyendo las denominadas "Fibras Paralelas". Las células grano reciben sinápsis de las fibras musgosas aferentes, y a su vez establecen sinápsis con las células de Purkinje. En la capa granular se localizan también las células Golgi, cuyas dendritas alcanzan la capa molecular y reciben sinápsis de la mayor parte de los tipos neuronales cerebelosos. Los axones de las células Golgi, se ramifican en la capa granular, y establecen sinápsis con las dendritas de las células grano, configurando, junto con las fibras musgosas aferentes, los glomérulos cerebelosos.

La capa de las células de Purkinje, es una monoacapa de 50-70  $\mu\text{m}$ , constituida por los somas de estas neuronas, prolongaciones de las células de Lugaro ocasionalmente y la glía de Bergmann. Las dendritas de las células de Purkinje se ramifican de forma arborescente en la capa molecular, donde reciben sinápsis de las fibras paralelas, de células estrelladas presentes en la capa molecular y de fibras trepadoras (aferencias extracerebelosas). Los axones de las células de Purkinje, se proyectan hacia los núcleos cerebelosos centrales.

La capa molecular o capa plexíforme, con un espesor que oscila entre 300-400  $\mu\text{m}$ , está formada por escasos elementos neuronales, células estrelladas y cesto. Ambas presentan sus arborizaciones dendríticas en la capa molecular y reciben sinápsis de las fibras paralelas. Los axones de las células estrelladas se ramifican cerca del soma neuronal y establecen sinápsis con las dendritas de las células de Purkinje; sin embargo, las células cesto, proyectan sus axones lejos del soma, siguiendo una hilera de troncos dendríticos de Purkinje. Tienen múltiples terminales que se ramifican envolviendo al soma de las células de Purkinje, formando un "cesto" de fibras.

Los dos tipos de fibras aferentes al cerebelo son las fibras musgosas y las fibras trepadoras. Las primeras entran en el cerebelo a través de los pedúnculos cerebelosos, alcanzando la corteza cerebelosa. a los núcleos cerebelosos centrales, llegan terminales colaterales que, en un sentido funcional, son los principales por su carácter excitatorio frente a la inhibición

producida por la terminal de Purkinje, que constituye la vía de salida de la corteza. En la capa granular forman de una a cuatro expansiones digitiformes, que establecen sinápsis con las dendritas de las células grano, constituyendo junto con los axones de las Golgi, los glomérulos cerebelosos. Existen otros glomérulos cerebelosos constituidos por las fibras trepadoras que sinaptan con las dendritas de las células grano.

Las fibras trepadoras, sinaptan directamente con las células de Purkinje. Sus ramificaciones "trepan" a lo largo del árbol dendrítico de las células de Purkinje.

Las técnicas de histofluorescencia de monoaminas (Falk & Hillarp, 1962) han permitido el descubrimiento de un tipo funcional de fibras que penetran en la capa granular, procedentes de la sustancia blanca y alcanzan la capa molecular, discurriendo paralelas a la superficie pial. Aunque establecen sinápsis con las dendritas de las células de Purkinje, su morfología parece diferente a las de las trepadoras (Hokfelt & Fuxe, 1969).

En la corteza cerebelosa, los distintos tipos neuronales se diferencian en su ubicación dentro de la laminilla y en la morfología de sus prolongaciones axónicas y dendríticas. De estas neuronas, las células de Purkinje, las grano y las Golgi, reciben información extracortical directa, mientras que el resto de las estirpes neuronales, las estrelladas y las cesto, son interneuronas que actúan modulando la respuesta de las primeras.

Además de las neuronas, la corteza cerebelosa posee una abundante población de células gliales, de las cuales algunas muestran características muy especiales. En la corteza cerebelosa pueden distinguirse los siguientes tipos de células gliales: células epiteliales de Golgi o glía de Bergmann, rodeando a las células de Purkinje, glía de Fañanás, en la porción inferior de la capa molecular, astrocitos protoplásmicos, particularmente abundantes en la capa granular, oligodendrocitos, en la capa granular y en la de las células de Purkinje, regiones donde aparecen axones mielinizados y finalmente microglía, localizados perivascularmente.

Se han identificado varios neurotransmisores posibles en las fibras musgosas, sin embargo, aún no existen evidencias claras de su intervención en las sinápsis de estas fibras aferentes. Se han puesto en evidencia acetilcolina y las enzimas implicadas en su metabolismo (Colin acetiltransferasa y acetilcolinesterasa) en las fibras musgosas (McIntosh, 1941; Feldberg & Vogt, 1948; Burgen & Chipman, 1951; Hebb & Silver, 1956). Igualmente, se han identificado catecolaminas, serotonina (Hökfelt & Fuxe, 1969), péptidos neuroactivos como sustancia P (Korte et al., 1980), encefalinas (Schulman et al., 1981) y somatostatina (Schulman et al., 1983).

La acción excitadora de las fibras trepadoras está mediada por glutamato (Guidotti et al., 1975) y aspartato (Nadi et al., 1977; Rea et al., 1980).



En el tercer tipo de fibras aferentes, las descritas por Falk & Hillarp (1962), se ha demostrado la presencia de catecolaminas e idolaminas.

Se han identificado fibras noradrenérgicas que ascienden a través de la capa granular y entran en la capa molecular donde emiten colaterales (Hökfelt & Fuxe, 1969; Bloom et al., 1971). Las técnicas de histofluorescencia han puesto de manifiesto, así mismo, la presencia en el cerebelo de fibras que contienen serotonina (Hökfelt & Fuxe, 1969), y provienen del núcleo del Rafe.

A pesar de que aún parecen existir algunos resultados contradictorios, el glutamato parece ser el principal neurotransmisor utilizado por las células grano (Young et al., 1974). El GABA es el principal neurotransmisor que media la acción de las interneuronas inhibitoras de la corteza cerebelosa: células cesto, estrelladas y Golgi (Hökfelt & Ljungdahl, 1970, 1972; Schon & Iversen, 1972). Además existen numerosas evidencias que sugieren el papel como neurotransmisor inhibitor de la taurina en las células estrelladas (Collins & Topiwala, 1974; López-Colomé et al., 1978; Okamoto & Sakai, 1979).

Las células de Purkinje, cuyos axones constituyen las eferencias de la corteza cerebelosa, está demostrado que utilizan GABA como neurotransmisor (Schulman, 1983).

## 8.- INMUNOHISTOQUIMICA:

En 1939 Coons introdujo por primera vez, un nuevo concepto en el diseño de la técnica histoquímica, basado en el uso y aprovechamiento de la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, mediante el uso de anticuerpos acoplados a trazadores fluorescentes. Así se inició el desarrollo de las técnicas inmunocitoquímicas. Actualmente estas técnicas son de uso generalizado, tanto en experimentación biológica, como en el diagnóstico histopatológico.

La mayoría de los anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica pertenecen a las IgG<sub>s</sub>; grandes glicoproteínas formadas por dos cadenas pesadas y dos ligeras, unidas mediante puentes disulfuro. Cada molécula completa de IgG posee dos sitios idénticos de unión al antígeno (a través del fragmento F<sub>ab</sub>). El fragmento cristalino (F<sub>c</sub>) es capaz de unirse a una gran variedad de moléculas (IgG<sub>s</sub>, proteína A, etc..), lo cual facilita la visualización de la reacción inmunológica a través del marcaje de estas últimas.

Estas técnicas, inicialmente aplicadas a nivel de la microscopía óptica, se han adaptado a la microscopía electrónica. A este nivel, resulta imprescindible, por una parte, mantener durante el proceso un tejido viable, compatibilizando la óptima preservación ultraestructural del mismo, con la conservación de

las propiedades químicas y funcionales de las moléculas a detectar. Por otra parte, resulta necesario disponer de unos trazadores electrodensos adecuados, para poner de manifiesto la reacción inmunológica a este nivel (Cuello, 1984; Müller-Hermelink & Hansmann, 1984; Wright, 1986; Esquerda Colell, 1990).

Como ocurre en el caso de todas la técnicas experimentales, para la técnica histoquímica se pueden describir cinco criterios de fiabilidad (Petrusz et al., 1976, 1980): eficacia, exactitud, precisión, sensibilidad y especificidad. La eficacia proporciona información sobre la relación que existe entre la intensidad de la reacción específica y el fondo. La exactitud relaciona un valor dado en ensayos cuantitativos, con el valor real. En inmunohistoquímica, la exactitud depende en gran medida del microscopio que se utilice; en particular, en la técnica del PAP este valor es de 20-80 nm. La precisión se refiere a la reproductibilidad de las medidas. Las técnicas inmunohistoquímicas, una vez estandarizadas, presentan un alto grado de precisión; sin embargo este valor no puede expresarse matemáticamente, ya que los resultados están en función de variaciones en la técnica, reactivos utilizados, obtención de antisueros, etc... La sensibilidad en inmunohistoquímica se puede definir como la concentración menor de un antígeno en un tejido, que es posible distinguir del fondo. Finalmente, la especificidad de esta técnica da cuenta de la capacidad del anticuerpo para detectar un determinante antigénico en particular, excluyendo a otro (Sternberger, 1979). A pesar de la especificidad del anticuerpo, en la aplicación de la técnica inmunohistoquímica se

debe satisfacer también la especificidad del método, es decir, durante la reacción todos los reactivos utilizados han de ser selectivos, de forma que no reaccionen con ningún otro componente tisular.

Aunque existen diversos trazadores enzimáticos que se han utilizado en inmunohistoquímica (Fosfatasa alcalina, citocromo fosfatasa ácida, etc.), la peroxidasa de rábano resulta ser el trazador enzimático más ampliamente usado. Además de su idoneidad para la detección a microscopía óptica, el producto del revelado con diaminobenzidina (DAB) (Graham & Karnowsky, 1966), tras su posterior osmificación, resulta opaco a los electrones. La peroxidasa ofrece, además, la posibilidad de ser aplicada en los diversos sistemas de detección indirecta del antígeno, contribuyendo a aumentar la sensibilidad de la técnica inmunohistoquímica, que desarrollada inicialmente para microscopía óptica, se pueden aplicar a la localización ultraestructural (PAP, Avidina-biotina, intensificación con plata, etc.). El principal inconveniente resulta ser la dificultad en la cuantificación de la reacción, y cierta difusión del producto de la reacción que limita, en cierto sentido, su resolución a nivel ultraestructural (Cuello, 1984; Esquerda Colell, 1990).

**II.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.**

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

A pesar de la existencia de numerosos estudios realizados hasta el momento sobre los capilares cerebrales y su microambiente, estos se han caracterizado por una falta de sistematicidad. Dada la importante función de los mismos como barrera selectiva entre el medio sanguíneo y el medio cerebral, resulta incuestionable el papel transcendental de su función en el SNC.

La elección de la corteza cerebelosa de la rata, como modelo experimental, se debe al profundo conocimiento de las estructuras y conexiones que constituyen la corteza cerebelosa, tanto a nivel morfológico como funcional. Ello nos permite reconocer de forma inmediata la naturaleza de las estructuras que se hallan presentes en el microambiente de los capilares cerebelosos.

Las referencias bibliográficas acerca de la inervación de los capilares cerebrales son contradictorias. Así mismo son escasos los estudios en relación con la inervación de los capilares cerebelosos.

Ello nos ha conducido a abordar de forma más profunda el análisis de las relaciones entre los mismos y las estructuras asociadas a su microambiente. Siendo indispensable esclarecer el papel de la glía perivascular y del tejido nervioso en el control

de la función de los capilares de la corteza cerebelosa, de forma que se puedan correlacionar los ajustes en la función capilar con las demandas requeridas por el tejido nervioso. Para poder abordar la investigación de forma más profunda, y dado que son casi inexistentes las referencias bibliográficas acerca de la localización de neuromediadores en la barrera hematoencefálica en la corteza cerebelosa, hemos considerado inexcusable el análisis inmunocitoquímico de los capilares cerebelosos y su microambiente.

Como objetivos concretos nos hemos planteado los siguientes:

**Primer objetivo:** Analizar ultraestructuralmente las características de los componentes que forman parte de la barrera hematoencefálica en la corteza cerebelosa de la rata.

**Segundo objetivo:** Llevar a cabo un estudio a microscopía electrónica de la relación anatómica entre componentes de naturaleza nerviosa, que se hallan en estrecha asociación con los capilares de la corteza cerebelosa.

**Tercer objetivo:** Poner de manifiesto, mediante la utilización de técnicas inmunocitoquímicas, la presencia en los capilares cerebelosos de la rata y su microambiente, de diferentes moléculas implicadas en procesos funcionales.

**Cuarto objetivo:** Analizar inmunocitoquímicamente la presencia de diversos neuromediadores en los distintos elementos de la barrera hematoencefálica de la corteza cerebelosa de la rata y en los componentes perivasculares asociados íntimamente.



### III.- MATERIAL Y MÉTODOS.

## 1.- MATERIAL:

En la realización de este trabajo se han utilizado ratas Wistar macho, de tres meses de edad (150-250 g), por ser un animal de experimentación de fácil adquisición y cuyo estudio permite una pronta comparación de resultados.

Como centro para el estudio de los capilares sanguíneos en en S.N.C., hemos elegido la corteza cerebelosa. Ello se debe, a que el conocimiento de la ultraestructura de los distintos componentes celulares que forman parte de la corteza cerebelosa, es esencial para poder distinguir entre los diversos elementos, nerviosos y gliales, que aparecen en contacto con los capilares sanguíneos.

## 2.- MÉTODOS:

### 2.1.- Microscopía electrónica de transmisión:

En el estudio ultraestructural de la barrera hematoencefálica de la corteza cerebelosa de rata, los animales de experimentación fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de Pentobarbital sódico ( $60 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Tras la inyección intraventricular de 0.5 ml de heparina sódica al 1% (v/v), con el fin de evitar la coagulación sanguínea, se procedió a realizar un lavado corto con PBS (0.1 M, pH=7.4). A continuación, y sin permitir que se produzcan interrupciones en

el flujo de perfusión, mediante toracotomía introdujimos vía aorta ascendente 500 ml de mezcla fijadora, mezcla aldehídica tamponada constituida por 4% (p/v) paraformaldehído y concentraciones variables de glutaraldehído (0.1 - 0.5%, v/v) en tampón fosfato 0.1 M (pH=7.4) (Karnowsky, 1965; Larsson, 1988). Se utilizó también como mezcla fijadora la solución de 4% (p/v) de paraformaldehído, 0.1-0.5% (v/v) glutaraldehído, 0.2% (p/v) de ácido pícrico en tampón fosfato 0.1M (pH=7.4).

Procedimos a la rápida, pero cuidadosa extracción del cerebro, para realizar posteriormente una postfijación durante 4h a 4°C para evitar retracción celular, en una solución de paraformaldehído (4%, p/v) en tampón fosfato 0.1M (pH=7.4).

Realizamos un lavado de las muestras en tampón fosfato (0.1M, pH=7.4), durante 2h. A continuación las muestras fueron sometidos a su postfijación, utilizando OsO<sub>4</sub> (1%, p/v) en tampón fosfato 0.1 M (pH=7.4).

El material biológico fue sometido a repetidos lavados en tampón fosfato y deshidratados en una serie alcohólica de gradación creciente. El alcohol de 70° contenía acetato de uranilo al 1% (p/v).

Tras la deshidratación del material, este fue sometido a tratamiento con óxido de propileno (5 minutos), e incluidos en araldita (Fluka Chemie AG) para ser procesados posteriormente. En la confección de bloques utilizamos cápsulas Beem, talladas

en una talladora TM 60 Reichert OM U3; los cortes semifinos (0.5-1  $\mu\text{m}$ ) obtenidos en un ultramicrotomo LKB III, fueron analizados, teñidos con azul de toluidina-borax (1:1), para localizar las zonas de interés. Los cortes ultrafinos, fueron montados sobre rejillas de cobre, contrastados con citrato de plomo y acetato de uranilo (Reynolds, 1963) y analizados utilizando un microscopio JEOL-100B, microscopio Philips EM 201 y microscopio JEOL JEM 1200 EX-II.

## 2.2.- Obtención de antisueros:

### 2.2.1.- anti-CAATasa (Aspartato aminotransferasa):

#### **2.2.1.1.- Aislamiento y purificación del antígeno.**

El antígeno fue adquirido de la casa Boehringer Mannheim. La actividad específica se determinó calculando la concentración proteica, (Lowry, 1951) y la actividad enzimática total (Karmen, 1955).

Una vez conocida la actividad específica de esta solución madre, esta se sometió a diálisis. Las bolsas de diálisis fueron primeramente hervidas durante 30 min. en 5% (p/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , lavadas con  $\text{H}_2\text{O}_d$ , hervidas durante 30 minutos con EDTA 50mM (pH=8), y lavadas finalmente con agua destilada. La solución madre se dializó frente a 2l de una solución de 2-mercaptoetanol, EDTA 1mM en tampón fosfato 10mM (pH=7.5). La diálisis se realizó en agitación constante, durante 12h a 4°C, y efectuando 2 cambios del tampón. Finalmente concluida la diálisis, se comprobó que el volumen final se había duplicado, resultando diluida a la mitad la concentración proteica.

El grado de pureza del preparado enzimático se comprobó realizando una electroforesis en placas de 10% SDS-poliacrilamida (Lamili, 1970). Tras revelar la presencia de proteínas con azul Coomassie se observó una banda principal y varias bandas menores.

### Electroforesis en placas:

Se prepararon placas 152x152x0.8 mm con 15 ml de gel de resolución y 6 ml de gel de empaquetamiento, utilizando los siguientes reactivos:

- . Tampón gel inferior: 0.4% de SDS en Tris-HCl 1.5M (pH=8.8).
- . Tampón gel superior: 0.4% de SDS en Tris-HCl 0.5M (pH=6.8).
- . Solución madre de acrilamida/bisacrilamida: 29.2% acrilamida, 0.8% N,N'-metilen-bis-acrilamida, y H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> hasta 100 ml.
- . Persulfato amónico 10 mg ml<sup>-1</sup>.
- . TEMED: N,N,N',N,-tetrametil-etilen-diamina. 175 µl/35 ml de tampón.

Los reactivos fueron utilizados siguiendo las siguientes proporciones:

#### **GEL INFERIOR (10%):**

|                               |       |                      |
|-------------------------------|-------|----------------------|
| Tampón para el gel            | ..... | 3.5 ml.              |
| Acrilamida                    | ..... | 5 ml.                |
| H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> | ..... | 6.2 ml.              |
| Persulfato amónico            | ..... | 250 µl/35 ml de gel. |
| TEMED                         | ..... | 175 µl/35 ml de gel. |

#### **GEL SUPERIOR (4%):**

|                               |       |                      |
|-------------------------------|-------|----------------------|
| Tampón para el gel            | ..... | 1.25 ml.             |
| Acrilamida                    | ..... | 0.8 ml.              |
| H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> | ..... | 3.93 ml.             |
| Persulfato amónico            | ..... | 250 µl/35 ml de gel. |
| TEMED                         | ..... | 175 µl/35 ml de gel. |

Se aisló la banda principal, que contenía la cAATasa, se diluyó en un tampón cuya composición se detalla a continuación y se efectuó una segunda electroforesis en gel SDS-poliacrilamida.

composición del tampón:

|                          |                 |
|--------------------------|-----------------|
| glicerol .....           | 20% (p/v).      |
| 2-mercaptoetanol .....   | 10% (p/v).      |
| SDS .....                | 4.6% (p/v).     |
| Tris-HCl .....           | 0.125M, pH=6.8. |
| Azul de bromofenol ..... | 0.1%.           |

Esta segunda electroforesis se efectuó en un tubo de electroforesis en cuya base se colocó un poco de gel y una bolsa de diálisis. El tampón de electroforesis contenía:

|                   |         |
|-------------------|---------|
| TRIZMA BASE ..... | 0.025M. |
| Glicina .....     | 0.192M. |
| SDS .....         | 0.1%.   |

Tras la electro-elución durante 12h aplicando 20mA de corriente eléctrica, la enzima que quedó atrapada en la bolsa de diálisis, fue sometida a liofilización. La enzima así purificada fue utilizada para la obtención de anticuerpos específicos.

**2.2.1.2.- Obtención del antisuero:**

El antisuero específico frente a la AATc purificada, se realizó en seis conejos albinos machos de la raza New Zealand, de tres meses de edad.

Antes de iniciar el proceso de inmunización, se extrajeron 5 ml de suero que posteriormente se utilizarán como suero normal de conejo.

En el proceso de inmunización se inyectaron un total de 300  $\mu\text{g}$  de cAAT, cuya actividad específica era de 370  $\text{mg ml}^{-1}$  en 0.5 ml de solución salina y 0.5 ml de adyuvante completo de Freund. La emulsión antigénica se inyectó subcutánea e intradérmicamente en varios puntos del dorso del animal. Transcurrida una semana, se inyectaron 4 dosis antigénicas como recuerdo de la primera, preparadas de idéntica forma que aquella, pero con 250  $\mu\text{g}$  de cAATasa y 0.5 ml de adyuvante incompleto de Freund.

A la semana se extrajo de las orejas de los conejos una muestra de sangre venosa, se mantuvo en estufa 1h a 50°C, para destruir las proteasas. Posteriormente se enfrió a 5°C, y se aisló el suero. El suero obtenido se centrifugó a 4500  $\text{rev min}^{-1}$ , para separar de nuevo el suero del sedimento.

La especificidad del antisuero frente a la cAATasa se comprobó efectuando una inmunodifusión doble (Ouchternoly, 1949). Así mismo, se comprobó que dicho antisuero no presentaba reacciones cruzadas frente a glutámico pirúvico transaminasa (E.C.2.6.1.2.), lactato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.27.), malato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.37.), glutámico deshidrogenasa (E.C.1.4.1.3.) y piruvato kinasa (E.C.2.7.1.40). Todos estos preparados enzimáticos fueron adquiridos a través de la casa Sigma Chemical Company.



El antisuero se dializó frente a un tampón fosfato 0.005M, durante 2 días a 5°C, realizando tres cambios del tampón.

Las IgGs específicas (anti-CAATasa) se purificaron mediante una cromatografía en columna (25 x 500 mm), empaquetada con DEAE-celulosa.

Preparación de la DEAE-CELULOSA:

- Se mezclaron 25g de DEAE-Celulosa con 500 ml de HCl 0.1N, durante 30 minutos, a temperatura ambiente.
- Filtrar en vacío para eliminar el líquido.
- añadir 500 ml de Na(OH) 1N.
- Filtrar en vacío para eliminar el líquido.
- Lavar con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, hasta neutralizar el pH.
- Lavar con tampón fosfato 0.005M (pH=7), y comprobar que el pH del eluido es neutro.
- secar y resuspender en 200 ml de tampón fosfato (pH=7).
- eliminar el aire.

Una vez preparado el gel, la columna se empaquetó teniendo la precaución de que no se formen burbujas. Se aplicaron 5 ml del suero dializado en la columna, con cuidado de no agitar la superficie del gel. Una vez que la muestra había penetrado, se añadieron 5 ml de tampón fosfato 0.005M. Para la formación de un gradiente lineal, se utilizaron dos recipientes con distintos tampones: 400 ml de tampón fosfato 0.005M (pH=7) (recipiente A), y 400 ml de tampón fosfato 0.05M (pH=7) (recipiente B). El

recipiente A estaba conectado a la columna, y los dos recipientes conectados entre si, de forma que el contenido de B pasaba a A, y el de este a la columna, agitando A con un agitador magnético.

Se recogieron fracciones de 5 ml en un colector de fracciones automático. La pureza de las IgG<sub>s</sub> se determinó mediante una inmunolectroforesis. Para ello se utilizaron los siguientes reactivos:

- 1.- Suero Normal de Conejo ..... 0.5 ml.
- 2.- Muestras de las IgG<sub>s</sub> del colector de fracciones de la columna ..... 0.5 ml.
- 3.- Tampón barbital pH=8.  
    Barbital sódico ..... 15.87 g.  
    HCl 0.1N ..... 230 ml.  
    H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> ..... hasta 2l.
- 4.- Agar puro 0.85%.
- 5.- Fuente de energía y cubeta de electroforesis.

El agar se disolvió a baño de María y se extendió sobre portaobjetos. Una vez que había solidificado, se realizaron los orificios y el canal central. Los orificios se llenaron con el suero normal de conejo, y se colocaron las placas en la cubeta., de tal forma que estos estuvieran cercanos al cátodo. Se fabricaron puentes con papel de filtro empapados en tampón, para favorecer el paso de la corriente eléctrica. A continuación se conectó la fuente de energía a la cubeta (4-6 voltios cm<sup>-1</sup>, durante 2 ó 3 horas). Una vez que las proteínas habían emigrado, se desconectó la fuente y se sacaron las placas.

El canal central se llenó de las IgG<sub>s</sub> procedentes del colector de fracciones. La placa se colocó sobre una superficie

nivelada y en una cámara húmeda durante 12 horas, para su posterior análisis visual.

#### 2.2.2.- anti-GABA:

##### **2.2.2.1.- Obtención del complejo antigénico:**

El antisuero fue obtenido según el método de Hodgson et al. (1985). Para ello, se inmunizaron conejos albinos de la raza New Zealand, con el complejo GABA-BSA, utilizando glutaraldehído como agente copulante. Para la obtención del complejo antigénico se disolvieron 50 mg de GABA en 1 ml de HCl (1N). Posteriormente se añadieron 2 ml de tampón fosfato 0.1M (pH=7), ajustando cuidadosamente el pH a la neutralidad con Na(OH) 0.5N. Esta solución se mezcló con 2 ml de una solución acuosa de BSA (pH=7.5) al 0.25% (p/v), añadiendo posteriormente 0.5 ml de solución de glutaraldehído al 25%. La solución se dejó reaccionar toda la noche a temperatura ambiente, manteniéndola en la oscuridad. El conjugado GABA-BSA resultado de la reacción, de un color pardo-amarillento, se sometió a diálisis contra PBS durante 24h a 4°C.

##### **2.2.2.2.- Obtención del antisuero:**

Seis conejos albinos de la raza New Zealand fueron inmunizados durante tres meses, mediante diversas inyecciones subcutáneas e intradérmicas del complejo antigénico GABA-BSA. La primera inyección se componía de 0.5 ml de la solución del

complejo y 0.5 ml de adyuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co.). El resto de las inyecciones, efectuadas a intervalos de veinte días, estaban formadas por 0.5 ml de la solución del conjugado antigénico GABA-BSA y 0.5 ml de adyuvante incompleto de Freund (Sigma Chemical Co.). Tras siete días de la última inyección se extrajo de las orejas de los conejos, una muestra de sangre venosa. El suero obtenido se mantuvo a 50°C durante 1 hora, con la finalidad de eliminar las proteasas presentes. Posteriormente se enfrió a 5°C, y se aisló el suero, centrifugando a 4500 rev min<sup>-1</sup>.

Las IgG<sub>s</sub> específicas contra GABA, se aislaron utilizando columnas de sefarosa-proteína A y de sefarosda-4B activada con CNBr, y acoplada esta última a GABA-tiroglobulina.

La especificidad del antisuero se determinó mediante los métodos de ELISA (Engwall & Perlman, 1971), DASS (Capel, 1975) y Hodgson (Hodgson et al., 1985). En el método de ELISA, el antisuero fue comprobado con complejos conjugados de GABA-BSA y GABA-tiroglobulina.

Según el método de Hodgson, se activaron tiras de papel de nitrocelulosa con polilisina y glutaraldehído. Se depositaron gotas de 0.5 µl de diversas soluciones (50 µmol - 500 nmol) de los siguientes compuestos: GABA, GABOB (ácido γ-amino-β-hidroxi-butírico), 1-glutamato, β-alanina, 1-aspartato, taurina, glicina, δ-aminovalerato y ε-aminocaproato, tratando posteriormente con 0.5 µl del antisuero en diluciones 1:500 -

1:2000.

Aplicando la técnica del DASS, el antisuero contra GABA fue tratado con 200 mM de cada uno de los siguientes productos: GABA, GABOB,  $\beta$ -alanina,  $\delta$ -aminovalerato y  $\epsilon$ -aminocaproato, acoplados a bolitas de poliacrilamida mediante glutaraldehído, y posteriormente comprobado según el método del DASS. Se llevó a cabo este análisis, con el antisuero contra GABA tratado previamente durante toda la noche a 4°C con una solución 0.1M de GABA.

### 2.2.3.- anti-Tiamina:

#### **2.2.3.1.- Obtención del complejo antigénico:**

La Tiamina fue purificada partiendo de un preparado comercial (Sigma Chemical Co.) tiamina-HCl, mediante la reacción con trietilamina (mol/mol). Tras centrifugación, el sobrenadante fue sometido a cromatografía en columnas de silicagel.

Se disolvieron 40 mg de la tiamina purificada y 40 mg de BSA en 4 ml de tampón fosfato 0.1M (pH=8), añadiendo posteriormente 0.5 ml de glutaraldehído al 25%. Se dejó reaccionar esta solución en oscuridad, durante toda la noche a temperatura ambiente, hasta que la aparición de un color pardo-amarillento reveló la formación del conjugado Tiamina-BSA. La solución fue dializada contra PBS, durante 24h a 4°C. La presencia de tiamina en el conjugado fue estimada mediante fluorescencia del tiocromo

originado en el conjugado (435 nm de emisión, 365 nm de extinción), (Burch et al., 1952).

#### **2.2.3.2.- Obtención del antisuero:**

Seis conejos albinos de la raza New Zealand fueron inmunizados mediante tres inyecciones del complejo antigénico tiamina-BSA obtenido. La primera inyección estaba constituida por 0.5 ml del conjugado y 0.5 ml de adyuvante completo de Freund. El resto de la inyecciones estaban formadas por 0.5 ml del complejo antigénico y 0.5 ml de adyuvante incompleto de Freund. Las inyecciones fueron efectuadas en intervalos de veinte días, y realizadas subcutánea e intradérmicamente en el dorso de los animales. Siete días después de la última inmunización, se extrajo sangre venosa de la oreja de los conejos.

Las IgG<sub>s</sub> fueron aisladas del suero total mediante precipitación con sulfato amónico. El precipitado se disolvió en tampón fosfato 0.1M (pH=7), y posteriormente se sometió a diálisis contra PBS toda la noche a 4°C, (antisuero A). Este antisuero fue purificado mediante inmunoadsorción (Cuatrecasas & Anfinsen, 1971): 2 ml del antisuero se mezclaron con sefarosa-4B activada con BrCN, acoplado a 70 mg de BSA. La mezcla, agitada durante 2h a temperatura ambiente, fue centrifugada posteriormente durante 20 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante resultante contenía las IgG<sub>s</sub> específicas contra tiamina, y no contra BSA, (antisuero B).

1 ml de este antisuero (antisuero B) purificado, se mezcló con 1g de sefarosa-4B activada con Bromuro de cianógeno (BrCN) acoplada a 35 mg de tiamina. La mezcla se mantuvo en agitación durante 2h a temperatura ambiente. A continuación, se sometió a centrifugación durante 20 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante resultante era un suero carente de las IgG<sub>s</sub> contra BSA y tiamina, (antisuero C).

La especificidades de estos sueros contra BSA, tiamina y BSA-tiamina, fueron determinadas mediante los métodos de inmunolectroforesis, inmunodifusión y el método del PAP sobre tiras de papel de nitrocelulosa, activadas con glutaraldehído (Hodgson et al., 1985)., usando 50  $\mu$ mol de tiamina y diluciones de 1:500, 1:1000 y 1:2000 del antisuero B. Los antisueros A, B y C fueron también analizados contra tiamina, tiamina-BSA, tiamina pirofosfato y tiamina tiroglobulina usando el método del DASS (Defined antigen substrate sphere) (Capel, 1975).

#### 2.2.4.- anti-fosfocreatina:

##### **2.2.4.1.- Obtención del complejo antigénico:**

La fosfocreatina fue purificada partiendo de un preparado comercial (Sigma Chemical Co.), mediante la reacción con trietilamina (mol/mol). Tras centrifugación, el sobrenadante fue sometido a cromatografía en columnas de silicagel.

Se disolvieron 60 mg de la fosfocreatina purificada y 60 mg de BSA en 6 ml de tampón fosfato 0.1M (pH=8), añadiendo posteriormente 0.5 ml de glutaraldehído al 25%. Se dejó reaccionar esta solución en oscuridad, durante toda la noche a temperatura ambiente, hasta que la aparición de un color pardo-amarillento reveló la formación del conjugado fosfocreatina-BSA. La solución fue dializada contra PBS, durante 24h a 4°C.

#### **2.2.4.2.- Obtención del antisuero:**

Seis conejos albinos de la raza New Zealand fueron inmunizados mediante tres inyecciones del complejo antigénico fosfocreatina-BSA obtenido. La primera inyección estaba constituida por 0.5 ml del conjugado y 0.5 ml de adyuvante completo de Freund. El resto de la inyecciones estaban formadas por 0.5 ml del complejo antigénico y 0.5 ml de adyuvante incompleto de Freund. Las inyecciones fueron efectuadas en intervalos de veinte días, y realizadas subcutánea e intradérmicamente en el dorso de los animales. Siete días después de la última inmunización, se extrajo sangre venosa de la oreja de los conejos.

Las IgG<sub>s</sub> fueron aisladas del suero total mediante precipitación con sulfato amónico. El precipitado se disolvió en tampón fosfato 0.1M (pH=7), y posteriormente se sometió a diálisis contra PBS toda la noche a 4°C. Este antisuero fue purificado mediante inmunoadsorción (Cuatrecasas & Anfinsen, 1971): 2 ml del antisuero se mezclaron con sefarosa-4B activada



con CNBr, acoplado a 70 mg de BSA. La mezcla, agitada durante 2h a temperatura ambiente, fue centrifugada posteriormente durante 20 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante resultante contenía las IgG<sub>s</sub> específicas contra fosfocreatina, y no contra BSA.

La especificidad del antisuero fue determinada mediante los métodos de inmunolectroforesis, inmunodifusión y el método del PAP sobre tiras de papel de nitrocelulosa, activadas con glutaraldehído (Hodgson et al., 1985), usando 50  $\mu$ mol de fosfocreatina y concentraciones de 1:500, 1:1000 y 1:2000 del antisuero.

### 2.3.- Método Immunohistoquímico del PAP:

Ratas Wistar machos fueron anestesiados utilizando inyección intraperitoneal de Pentobarbital sódico ( $60 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Tras la inyección intraventricular de 0.2 ml de heparina sódica al 1% (v/v), se procedió a realizar un lavado corto con PBS (0.1 M, pH=7.4). A continuación, y sin permitir que se produzcan interrupciones en el flujo de perfusión, mediante toracotomía, introdujimos vía aorta ascendente, 500 ml de mezcla fijadora, durante 40 minutos aproximadamente, mezcla aldehídica tamponada constituida por 4% (p/v) paraformaldehído y concentraciones variables de glutaraldehído (0.1 - 0.5 %, v/v) en tampón fosfato 0.1 M (pH=7.4) (Karnowsky, 1965; Larsson, 1988), con el fin de compatibilizar una óptima preservación morfológica, con la conservación de las propiedades antigénicas, químicas y/o funcionales de las moléculas a detectar. Así mismo, se utilizaron también como mezclas fijadoras la solución de 4% (p/v) de paraformaldehído, 0.1% (v/v) glutaraldehído, 0.2% (p/v) de ácido pícrico en tampón fosfato 0.1M (pH=7.4), o solución de 4% (p/v) de paraformaldehído, 0.1% (v/v) glutaraldehído, en tampón cacodilato 0.1M (pH=7.4).

Procedimos a la rápida, pero cuidadosa extracción del cerebro, para realizar posteriormente una postfijación durante 4h a  $4^{\circ}\text{C}$  para evitar retracción celular, en una solución de paraformaldehído (4%, p/v) en tampón fosfato 0.1M (pH=7.4).

Realizamos un lavado de las muestras en tampón fosfato (0.1M, pH=7.4), durante 2h, tras lo cual procedimos a la crioprotección de las muestras tisulares utilizando sacarosa 0.1M en tampón fosfato 0.1M (pH=7.4) durante 3h a 4°C, y sacarosa 2.3M en tampón fosfato (0.1M, pH=7.4) durante toda la noche a 4°C, o utilizando 25 ml de propilen glicol junto con sacarosa al 30% (p/v) en 25 ml de tampón fosfato (0.1M, pH=7.4).

Los cortes de 30-40  $\mu$ m obtenidos mediante criotomía de congelación, fueron lavados repetidas veces utilizando PBS 0.1M (pH=7.4) y tratados con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3% (v/v) en PBS (0.1M, pH=7.4) durante 30 minutos, para llevar a cabo la inhibición de la peroxidasa endógena. Tras repetidos lavados de los cortes con PBS (0.1M, pH=7.4), los cortes fueron tratados con 1% (p/v) de NaBH<sub>4</sub> (Sigma Chem. Co.) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, con la finalidad de revertir en parte la fijación y restablecer con ello la antigenicidad (Baschong et al., 1983).

Los cortes se lavaron repetidas veces en PBS, y posteriormante, fueron tratados con una solución centrifugada durante 15 minutos a 3000 g, 0.5 M de L-lisina en PBS durante 2h a temperatura ambiente, o glutamina 0.5 M en PBS con la finalidad de bloquear los grupos aldehídos libres.

A continuación se procedió a la detección inmunohistoquímica de diversas moléculas, mediante inmunomarcaje indirecto, siguiendo el método del PAP (Sternberger et al., 1970; 1979).

### 2.3.1.- Antisueros policlonales:

Los cortes fueron incubados con suero normal de cabra (1:1) diluido en PBS durante 1h, incubando a 37°C en agitación constante.

Procedimos a continuación a incubar con el antisuero específico, incubando primero durante 2h a temperatura ambiente y posteriormente toda la noche en nevera, manteniendo en cualquier caso el medio de incubación en constante agitación. Los anticuerpos específicos utilizados, fueron diluidos en PBS usando las diluciones que se especifican a continuación:

rabbit anti-GABA p (1:100, 1:200), Nuestro laboratorio.

rabbit anti-GAD p (1:200), Chemicon International Inc., USA.

rabbit anti-Taurina p (1:100, 1:200), Chemicon International Inc., USA.

rabbit anti-Glicina p (1:100, 1:200), Chemicon International Inc., USA.

rabbit anti-ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> p (1:5), Chemicon International Inc., USA.

rabbit anti-Serotonina p (1:200), Chemicon International Inc., USA.

rabbit anti-AATasa p (1:200, 1:500), Nuestro laboratorio.

rabbit anti-Fosfocreatina p (1:500, 1:1000), Nuestro laboratorio.

rabbit anti-Tiamina p (1:200, 1:500), Nuestro laboratorio.

goat anti-clatrina p (1:40), Chemicon International Inc., USA.

Tras repetidos lavados con PBS, procedimos a la incubación de los cortes con suero de cabra anti-conejo (1:20) para los anticuerpos obtenidos en conejo y suero de conejo anti-cabra (1:50) para los obtenidos en cabra, diluidos en PBS, durante 2h

a temperatura ambiente, manteniendo en agitación constante el medio de incubación.

Lavamos los cortes en PBS, mediante tres lavados de 15 minutos cada uno.

Incubamos con el complejo PAP-rabbit (1:500) diluido en PBS o PAP-goat (1:500) dependiendo del origen del anticuerpo específico, durante hora y media a temperatura ambiente, agitando de forma permanente el medio de incubación.

Tras efectuar repetidos lavados de los cortes con tampón TRIS-HCl (pH≈7.4), los cortes fueron incubados en una solución de 0.5 mg ml<sup>-1</sup> de DAB (3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride, Sigma Chem. Co.) diluida en tampón TRIS (0.1M, pH=7.4), durante 15 minutos, a temperatura ambiente y en agitación.

Se procedió a continuación al revelado de la inmunorreacción, incubando los cortes en una solución de 0.5 mg ml<sup>-1</sup> de DAB y 0.01% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tampón TRIS, durante 5-10 minutos a temperatura ambiente.

### **2.3.2.- Antisueros monoclonales:**

Los cortes fueron incubados con el antisuero específico, incubando primero durante 2h a temperatura ambiente y posteriormente toda la noche en nevera, manteniendo en cualquier caso el medio de incubación en constante agitación. Los

anticuerpos específicos utilizados, fueron diluidos en PBS usando las diluciones que se especifican a continuación:

mouse anti-GABA m (1:100, 1:200), Chemicon International Inc., USA.

mouse anti- $\alpha$  actina (1:200), Chemicon International Inc., USA.

Tras repetidos lavados con PBS, procedimos a la incubación de los cortes con suero de cabra anti-mouse (1:20) diluido en PBS, durante 2h a temperatura ambiente, manteniendo en agitación constante el medio de incubación.

Lavamos los cortes en PBS, mediante tres lavados de 15 minutos cada uno.

Incubamos con el complejo PAP-mouse (1:800) diluido en PBS, durante hora y media a temperatura ambiente, agitando de forma permanente el medio de incubación.

Tras efectuar repetidos lavados de los cortes con tampón TRIS-HCl (pH=7.4), los cortes fueron incubados en una solución de 0.5 mg ml<sup>-1</sup> de DAB (3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride, Sigma Chem. Co.) diluida en tampón TRIS (0.1M, pH=7.4), durante 15 minutos, a temperatura ambiente y en agitación.

Se procedió a continuación al revelado de la inmunorreacción, incubando los cortes en una solución de 0.5 mg ml<sup>-1</sup> de DAB y 0.01% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tampón TRIS, durante 5-10 minutos a temperatura ambiente.

### 2.3.3.- Procesamiento del material:

Tras el lavado de los cortes en PBS y posteriormente en tampón fosfato (0.1M, pH=7.4), se dividió el material en dos lotes, destinados para su estudio tanto a microscopía óptica como electrónica.

Los cortes seleccionados para su estudio a microscopía óptica fueron montados en portaobjetos que previamente habían sido tratados con una mezcla de gelatina / cromalumbre. Tras su deshidratación en una serie creciente de alcoholes, los cortes fueron montados utilizando bálsamo del Canadá.

Utilizamos la técnica de la metenamina de plata (Gallyas et al., 1982), con el fin de intensificar la reacción en algunos cortes seleccionados previamente. Para ello, se incubaron los cortes en una solución de metenamina de plata durante 10 minutos en estufa a 56°C. tras tres lavados de 15 minutos en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, se trataron estos, el material histológico fue tratado con una solución 0.2% (p/v) de AgCl<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> durante 2 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar nuevamente los cortes en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, se trataron estos con tiosulfato sódico al 2.5% (p/v) en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, durante 2 minutos a temperatura ambiente. Finalmente el material fue lavado con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, deshidratando mediante una serie de alcoholes en gradación creciente y montándolos utilizando bálsamo del Canadá.

Los cortes que previamente fueron seleccionados para su estudio a microscopía electrónica, fueron lavados en abundante tampón fosfato 0.1 M (pH=7.4). A continuación los cortes fueron sometidos a su osmificación, utilizando  $\text{OsO}_4$  (1%, p/v) en tampón fosfato 0.1 M (pH=7.4).

El material biológico fue sometido a repetidos lavados en tampón fosfato y deshidratados en una serie alcohólica de gradación creciente. El alcohol de 70<sup>0</sup> contenía acetato de Uranilo al 1% (p/v). Tras la deshidratación del material, este fue sometido a tratamiento con óxido de propileno (5 minutos), e incluidos en Araldita (Fluka Chemie AG) (Hogan & Smith, 1982), para ser posteriormente procesados. Los cortes fueron montados en plano y tras la polimerización, estos fueron examinados a microscopía óptica: las regiones de interés fueron reincluidas en araldita, utilizando en la confección de bloques cápsulas Beem, talladas en una talladora TM 60 Reichert OM U3. Los cortes semifinos (0.5-1  $\mu\text{m}$ ) obtenidos en un ultramicrotomo LKB III, fueron analizados, teñidos con azul de toluidina-borax (1:1), para localizar las zonas de interés. Los cortes ultrafinos, fueron montados sobre rejillas de cobre de 75, 100 y 150 mesh, contrastados con citrato de plomo y analizados utilizando un microscopio JEOL-100B, microscopio Philips EM 201 y microscopio JEOL JEM 1200 EX-II.



#### 2.3.4.- Controles de especificidad:

##### 2.3.4.1.- De los anticuerpos:

Los controles de especificidad de los antisueros obtenidos en nuestro laboratorio, se han especificado previamente los controles de especificidad realizados.

Para los anticuerpos que en este estudio han sido adquiridos a través de la casa comercial Chemicon International Inc., USA., los protocolos de especificidad han sido publicados previamente, determinándose que las posibles reacciones cruzadas determinadas mediante técnicas de ELISA y RIA, son consideradas nulas o cercanas a niveles no detectables.

##### 2.3.4.2.- De la reacción inmunohistoquímica:

En todas las reacciones inmunohistoquímicas realizadas, se llevaron a cabo paralelamente los siguientes controles:

a.- Sustitución del antisuero específico por suero normal de conejo, cabra o ratón, dependiendo de cada una de las reacciones.

b.- Omisión del antisuero específico.

c.- La utilización del antisuero específico preadsorbido previamente con el antígeno correspondiente, (en relacion de 200 $\gamma$  de Ag/ ml de anticuerpo puro). Este control sólo pudo ser

llevado a cabo en los casos en los que se dispuso del correspondiente antígeno purificado (GABA, tiamina, fosfocreatina, glicina, taurina, serotonina).

**IV.- RESULTADOS.**

# 1.- ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LOS CAPILARES CEREBELOSOS Y SU MICROAMBIENTE:

Los capilares cerebrales representan la base morfológica y funcional de la barrera hematoencefálica. La corteza cerebelosa está profusamente vascularizada, siendo los capilares más numerosos en la capa granular. La barrera hematoencefálica cerebelosa está constituida por las células endoteliales que delimitan la luz del capilar, los pericitos, la lámina basal y otras estructuras perivasculares, la glía perivascular. Estas prolongaciones de la glía perivascular junto con las estructuras de naturaleza nerviosa asociadas íntimamente a la pared capilar, constituyen el microambiente de los capilares cerebelosos (Fig. 1).

Las células del endotelio de los capilares cerebelosos son células típicamente polarizadas. Forman cinturones continuos alrededor de la luz capilar, sellando sus bordes imbricados mediante uniones estrechas (Figs. 2, 16, 43, 53 y 62). Los capilares cerebelosos presentan un diámetro que varía entre 2-4  $\mu\text{m}$ . Es frecuente observar así mismo, pliegues marginales a menudo voluminosos haciendo protusión hacia la luz de los vasos sanguíneos.

En relación al volumen celular, la célula endotelial posee un núcleo de gran tamaño, este aparece alargado y con la

cromatina condensada formando acúmulos bajo el envoltorio nuclear (Fig. 3).

En la porción luminal de la célula endotelial aparecen a menudo microvellosidades, a modo de cortas prolongaciones digitiformes que hacen protusión en la luz del capilar sanguíneo, (Figs. 4 y 80).

A pesar del delgado citoplasma que tapiza el capilar cerebeloso, las células endoteliales son ricas en atributos citoplásmicos. El citoplasma de la célula endotelial aparece generalmente de mediana densidad electrónica. El sistema de endomembranas, retículo endoplasmático y complejo de Golgi, extensamente desarrollados, dan cuenta de la elevada actividad de las células endoteliales en el S.N.C.

El retículo endoplasmático está constituido por numerosas y largas cisternas de contorno estrecho, dispuestas de forma paralela a la membrana plasmática, (Fig. 5).

El complejo de Golgi aparece muy desarrollado, consiste en un sistema complejo de cisternas, ordenadas paralelamente unas a otras formando sacos aplanados. Sus vesículas aparecen ligeramente más ensanchadas en los extremos. Este complejo se dispone de forma generalmente perínuclear, (Figs. 6 y 8). La mayor parte de la vesículas golgianas presentan un contenido claro a los electrones, (Figs. 7 y 8).

Las mitocondrias son numerosas, y aunque dispersas por todo el citoplasma, resulta frecuente observarlas cercanas al núcleo. Poseen generalmente forma esférica u ovalada, con numerosas crestas transversales paralelas entre si.

Cabe destacar un número ciertamente notable de vesículas de pinocitosis diseminadas por el citoplasma endotelial. Son vesículas de contenido claro a los electrones (Figs. 9 y 10); sin embargo, aparecen ocasionalmente vesículas de contenido denso a los electrones, (Fig. 11). Se pueden observar así mismo, vesículas de pinocitosis asociadas tanto a la membrana luminal de la célula endotelial, (Figs. 12, 13 y 131), como asociadas a la membrana plasmática que limita la región abluminal de la célula (Fig. 13).

Ocasionalmente pueden observarse cuerpos multivesiculares de gran volumen en el citoplasma de la célula endotelial, (Fig. 14), que llegan a hacer protusión en la luz del capilar.

El pericito se halla separado de la célula endotelial por una lámina basal. Esta lámina basal presenta una densidad electrónica media-baja, pero a menudo aparece sumamente delgada y su presencia sólo se hace distinguible a considerables aumentos. Aunque la presencia de los pericitos es frecuente en los capilares cerebelosos, estos no se hallan presentes de forma permanente.

Los pericitos son células de núcleo redondeado y voluminoso. La cromatina aparece condensada periféricamente. Su citoplasma, generalmente de menor densidad electrónica que el de las células endoteliales, emite largas prolongaciones que abrazan a la célula endotelial casi en su totalidad. Hemos advertido pericitos cuyas prolongaciones pueden abrazar a varios capilares (Fig. 15). Los extremos citoplásmicos de los pericitos se unen sellando sus bordes gracias a la formación de uniones estrechas.

Hemos observado, en disposición generalmente perinuclear, aunque no exclusivamente, el complejo de Golgi muy desarrollado, formado por sacos o cisternas apiladas, ensanchados en sus extremos formando vesículas Golgianas abundantes y de mediana densidad electrónica (Fig. 16).

La mayoría de los pericitos presentan un moderado desarrollo del retículo endoplásmico liso; este se presenta en forma de cisternas estrechas, poco dilatadas y distribuidas por todo el citoplasma celular, sin una aparente organización (Fig. 23).

Los pericitos son, así mismo, células ricas en mitocondrias. Aparecen de forma general cercanas al núcleo celular, pero pueden observarse distribuidas por todo el citoplasma celular (Fig. 17). Presentan una morfología globular o alargada y crestas transversales abundantes (Figs. 18 y 147).

Muy frecuentemente observamos estructuras vesiculares de aspecto elipsoidal y contenido claro a los electrones (Figs. 16, 18, 19, 20 y 28) o cuyo contenido aparece con mayor densidad electrónica. Así mismo, aparecen estructuras vesiculares de morfología irregular, (Figs. 13, 21, 22 y 146).

Hemos advertido la presencia de numerosas estructuras lisosomales presentes en el interior del pericito. La característica más notable de los lisosomas es su polimorfismo, tanto en cuanto a lo que respecta a su tamaño, como a la irregularidad de su estructura interna (Figs. 23 y 134).

Tanto las células endoteliales como los pericitos se hallan rodeados en su porción abluminal por una lámina basal. Rodeando a esta, se encuentra la glía perivascular formando una vaina que envuelve al capilar, aunque no de forma totalmente continua. La glía perivascular aparece cubriendo parcialmente al capilar cerebeloso.

La glía astrocitaria perivascular se caracteriza por la presencia de un núcleo oval o esférico, de gran volumen y cuya cromatina se presenta escasamente condensada (Fig. 24). El citoplasma glial, de escasa densidad electrónica, emite grandes prolongaciones que recubren casi totalmente la pared de los capilares. Es característico observar la presencia de gliofibrillas y gliofilamentos en el citoplasma glial (Figs. 25 y 105), dando un aspecto esponjoso al citoplasma. A menudo estos gliofilamentos aparecen agrupados en haces (Figs. 48, 28 y 101).



La célula glial es rica en mitocondrias, estas aparecen de gran densidad electrónica, generalmente muy elongadas y con abundantes crestas (Figs. 24, 26, 105 y 131). Los ribosomas libres son escasos, sin embargo estos aparecen formando parte del retículo endoplásmico presente en el citoplasma. Este sistema de endomembranas se compone de escasas cisternas alargadas y poco dilatadas, y de contenido escasamente denso a los electrones. El complejo de Golgi presente en esta estirpe celular está constituido por escasos sacos membranosos apilados y vesículas golgianas de contenido claro a los electrones. Aparentemente no se ha observado ninguna preferencia en la distribución subcelular del sistema de endomembranas, tanto del retículo endoplásmico, como del complejo de Golgi.

El envoltorio glial perivascular no constituye una capa totalmente continua, es decir, las prolongaciones gliales se interrumpen para permitir que diversas estructuras de naturaleza nerviosa, entren en contacto con la lámina basal que subyace a la estructura de la pared capilar. De esta forma, nuestros estudios a microscopía electrónica nos han permitido observar que diversos componentes de la corteza cerebelosa pueden tener acceso a la pared capilar, tanto a nivel del pericito como de la propia célula endotelial.

Los capilares sanguíneos presentes en las diversas capas de la corteza cerebelosa presentan una morfología similar; sin embargo, en base a su presencia en una u otra capa de la laminilla cerebelosa, podemos distinguir distintos elementos en

estrecha asociación con la pared capilar.

En los capilares presentes en la capa granular, nuestros estudios a microscopía electrónica nos han permitido observar gran número de células grano, las más pequeñas y numerosas de esta capa celular, en estrecha asociación con los elementos vasculares. Aunque la mayor parte de las células grano están separadas de los capilares mediante el envoltorio glial (Fig. 27), hemos puesto en evidencia un gran número de células grano que aparecen en estrecho contacto con la lámina basal que rodea al pericito (Figs. 28 y 29), y la que rodea a la propia célula endotelial (Figs. 30 y 32). El envoltorio glial perivascular aparece discontinua en numerosos puntos, permitiendo el contacto entre estos elementos nerviosos y los componentes vasculares.

Las células Golgi presentes así mismo en esta capa cerebelosa y que se caracterizan por su riqueza en retículo endoplásmico rugoso, complejo de Golgi y ribosomas libres, han sido observadas en contacto con la membrana basal que rodea a la célula endotelial y al pericito en la capa granular, (Figs. 31 y 32).

La observación detallada de los vasos presentes en la capa granular nos ha permitido poner de manifiesto la existencia de terminaciones axónicas en relación con el microambiente capilar. La mayor parte de estos axones mantienen con la pared capilar una relación de vecindad, pudiendo observarse la

presencia de prolongaciones gliales interpuestas (Fig. 33). A pesar de ello, el exhaustivo análisis nos permite observar la presencia de terminaciones axónicas en estrecho contacto con la membrana basal que rodea al pericito y a la célula endotelial (Figs. 34, 35 y 36).

En esta misma línea , ha sido posible evidenciar fibras musgosas aferentes en estrecha asociación con el microambiente capilar. A pesar de que a menudo puede observarse glía perivascular, interpuesta entre estos elementos de naturaleza nerviosa y los constituyentes de la pared vascular (Figs. 37 y 38), resulta frecuente observar fibras musgosas en estrecha asociación con la membrana basal de la pared capilar (Figs. 39, 40 y 41). De igual forma, es posible distinguir axones de células Golgi, en estrecho contacto con la membrana basal de los capilares cerebelosos (Fig. 41).

En la capa de las células de Purkinje, el análisis a microscopía electrónica nos ha permitido poner de manifiesto la presencia de axones de células Cesto que, además de establecer sinápsis con el citoplasma de las células de Purkinje, se mantienen en estrecho contacto con la membrana basal que rodea a la pared de los capilares cerebelosos, (Fig. 42). También ha sido posible evidenciar la presencia de citoplasmas de células de Purkinje en estrecho contacto con la pared capilar (Fig. 137).

En la capa molecular de la laminilla cerebelosa, el análisis a microscopía electrónica demuestra la relación entre

células estrelladas y células cesto, en asociación con la membrana basal que rodea a los elementos vasculares, pericito y célula endotelial (Fig. 43, 75 y 76).

En la capa molecular de la corteza cerebelosa, el estudio ultraestructural nos ha permitido poner de manifiesto la existencia de terminaciones axónicas en el microambiente capilar. A pesar de que a menudo los axones están separados de la pared vascular a través de glía perivascular (Fig. 44), es posible observar terminales axónicos en estrecho contacto con la membrana basal que rodea al pericito (Figs. 45 y 46) y a la célula endotelial (Figs. 47, 48, 49, 50 y 51).

De la misma forma que podemos identificar la existencia de fibras paralelas, separadas del microambiente de los capilares cerebelosos por la presencia de un envoltorio de naturaleza glial (Figs. 52, y 53), hemos podido observar la presencia de fibras paralelas en estrecho contacto con la membrana basal que rodea al pericito y a la célula endotelial (Fig. 54).

El envoltorio glial perivascular resulta discontinuo en numerosos puntos, permitiendo así el contacto entre estos elementos nerviosos y la pared capilar, (Esquema I).

Concretamente, en la corteza cerebelosa de la rata, el análisis ultraestructural permite demostrar que los distintos elementos de naturaleza nerviosa que constituyen la laminilla

cerebelosa tienen, en algunos puntos, acceso directo a la pared vascular (Esquema II).

Sin embargo, para determinar la naturaleza química de las estructuras nerviosas que se hallan en contacto directo con los diversos elementos que forman parte de la barrera hematoencefálica, hemos realizado marcaje inmunohistoquímico, siguiendo el método del PAP (Sternberger et al., 1970).

## 2.- OBTENCIÓN DEL ANTÍGENO cAATasa PURO:

La electroforesis, en gel de 10% SDS-poliacrilamida, del preparado comercial de la casa Boeringer Mannheim (L-Aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC. 2.6.1.1, de corazón de cerdo), y su posterior revelado utilizando azul Coomassie, reveló la presencia de una banda principal que correspondía a la cAATasa y varias bandas menores.

Tras la purificación de la banda principal mediante 12h de electroelución, comprobamos la pureza del producto resultante mediante una segunda electroforesis en gel de 10% SDS-poliacrilamida.

La tinción de esta electroforesis con azul Coomasie reveló la presencia de una única banda que correspondía a la cAATasa desnaturalizada, pero con un mayor grado de pureza.

### 3.- OBTENCIÓN DEL ANTISUERO ESPECÍFICO FRENTE A LA cAATasa:

La aplicación del test de inmunodifusión doble de Ouchternoly (1949) al análisis de la cAATasa como antígeno, y como anticuerpo el antisuero elaborado según el protocolo descrito previamente en el apartado de material y métodos, nos reveló la presencia de una banda de precipitación como resultado de una reacción positiva.

En los test de Ouchternoly, utilizados para verificar las posibles reacciones cruzadas del antisuero con los posibles contaminantes tales como glutámico pirúvico transaminasa (E.C.2.6.1.2), lactato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.27), malato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.37), glutámico deshidrogenasa (E.C.1.4.1.3) y piruvato kinasa (E.C.2.7.1.40), no se observó la existencia de ninguna banda de precipitación.

El análisis de la fracción de las IgG<sub>s</sub>, resultantes de la purificación por cromatografía de columna empaquetada con DEAE-celulosa, por medio de una inmunolectroforesis, reveló la existencia de una única banda de precipitación.

#### 4.- OBTENCIÓN DEL ANTISUERO ESPECÍFICO FRENTE A GABA:

Observamos que el antisuero frente a GABA presentaba reacción, en test de inmunodifusión frente a BSA, y a los conjugados de BSA-GABA y BSA-Baclofen; y en el test de ELISA frente a BSA-GABA, BSA-Baclofen, tiroglobulina-GABA y tiroglobulina-Baclofen. Antes de la purificación el suero presentaba reacción cruzada frente a GABOB (ácido  $\gamma$ -amino- $\beta$ -hidroxibutírico),  $\beta$ -alanina,  $\delta$ -aminovalerato y  $\epsilon$ -aminocaproato.

La reacción cruzada con cada uno de estos compuestos quedó anulada mediante el tratamiento del antisuero con las correspondientes sustancias, acopladas a bolas de poliacrilamida mediante glutaraldehído.

El test de inmunorreacción realizado sobre tiras de papel de nitrocelulosa (Hodgson), con 50  $\mu$ mol-500 nmol de los antígenos correspondientes, reveló inmunorreacción del antisuero sólo frente a GABA.

Observamos que la dilución 1:1000 resultó ser la que proporcionó los óptimos resultados en estos tests.



##### 5.- OBTENCIÓN DEL ANTISUERO ESPECÍFICO FRENTE A TIAMINA:

En el complejo conjugado Tiamina-BSA utilizado en el protocolo de inmunización, la concentración de tiamina fue estimada en 25 moléculas de Tiamina por cada molécula de BSA, de acuerdo con la determinación mediante fluorescencia.

En el test de inmunodifusión se observó inmunorreacción positiva, contra BSA y Tiamina-BSA, en el suero A; mientras que no existía reacción contra estos antígenos para los antisueros B y C, puesto que los anticuerpos contra BSA fueron adsorbidos mediante sefarosa-4B-BrCN acoplada a BSA. Ninguno de los antisueros mostraba reacción positiva con Tiamina o Tiamina pirofosfato en los test de inmunodifusión, como ocurre generalmente con las moléculas hapténicas. En los tests de inmunodifusión de los sueros A, B y C se demostró reacción negativa con tiroglobulina-Tiamina, porque tales sueros carecen de anticuerpos contra tiroglobulina. Tanto el antisuero A como B, mostraron reacción positiva frente a los conjugados BSA-Tiamina y tiroglobulina-Tiamina y contra Tiamina o Tiamina-pirofosfato en el método del DASS, ya que contienen anticuerpos contra Tiamina; sin embargo, no se observa reacción con el antisuero C. De igual forma, los antisueros A y B mostraron reacción positiva en tiras de nitrocelulosa activadas con glutaraldehído y acopladas a Tiamina o Tiamina-pirofosfato, mientras que el antisuero C no muestra reacción en tal test.

La mayor intensidad de la reacción del antisuero B, medida gracias a la utilización de un densitómetro, en las tiras de papel de nitrocelulosa, fue estimada en la dilución de 1:500. Como control, las tiras de papel de nitrocelulosa activadas con glutaraldehído, fueron tratadas con hemocianina (50  $\mu$ mol) en vez de Tiamina o Tiamina-pirofosfato, y posteriormente procesadas de acuerdo con el método del PAP.

Las reacciones inmunohistoquímicas fueron positivas con los antisueros A y B, y negativas, sin embargo, con el antisuero C, al igual que ocurría al suprimir el antisuero específico en el método del PAP. Las moléculas semejantes a Tiamina fueron demostradas en las secciones histológicas con el antisuero B en diluciones 1:1000 y 1:2000.

## 6.- OBTENCIÓN DEL ANTISUERO ESPECÍFICO FRENTE A FOSFOCREATINA:

En el complejo conjugado fosfocreatina-BSA utilizado en el proceso de inmunización, se estimó la concentración de fosfocreatina en  $8.8 \text{ mg ml}^{-1}$ .

Observamos que inicialmente el antisuero presentaba reacción, en el test de inmunodifusión, frente a BSA y a BSA-fosfocreatina. La reacción cruzada con cada uno de estos compuestos quedó anulada mediante el tratamiento del antisuero con las correspondientes sustancias acopladas a las bolas de poliacrilamida mediante glutaraldehído.

En el test de Hodgson llevado a cabo sobre tiras de papel de nitrocelulosa, utilizando  $50 \text{ } \mu\text{mol}$  de los antígenos, reveló inmunorreacción positiva sólo frente a fosfocreatina.

Las reacciones inmunoquímicas demostraron que las diluciones 1:500 y 1:1000 eran las que proporcionaban los óptimos resultados.

## 7.- INMUNOLocalIZACIÓN DE GABA:

La técnica del inmunomarcaje indirecto se ha llevado a cabo utilizando el método del PAP, y usando diluciones 1:100 y 1:200 de los dos antisueros específicos contra GABA, en primer lugar el obtenido en nuestro laboratorio, según el protocolo ya mencionado en el apartado de material y métodos, y en segundo lugar el monoclonal suministrado por la casa comercial.

El estudio de la inmunolocalización de GABA a microscopía óptica pone de manifiesto la presencia de fuerte inmunorreacción en terminaciones de las células cesto que se hallan rodeando a las células de Purkinje (Figs. 55 y 57), y en el cono axonal de las propias células de Purkinje (Fig. 56).

A microscopía óptica hemos observado inmunoteñidos contra GABA el endotelio de los capilares presentes tanto en la capa molecular como granular (Figs. 57 y 58), así como diversas estructuras celulares que se hallan rodeando a los capilares cerebelosos (Figs. 56 y 58).

Sin embargo, la microscopía óptica no permite discernir la naturaleza exacta de las estructuras, inmunoteñidas contra GABA, que se hallan en contacto con los elementos vasculares. Por ello el análisis ultraestructural se hace absolutamente imprescindible para nuestro propósito.

El análisis a microscopía electrónica de la distribución del inmunomarcaje frente a GABA en la corteza cerebelosa de rata, nos ha permitido distinguir reacción positiva en el citoplasma de la célula endotelial que constituye el capilar (Fig. 59), tanto en los capilares presentes en la capa granular como en la capa molecular. La reacción se observa como un precipitado denso electrónicamente muy patente, y distribuido de forma homogénea por todo el citoplasma endotelial.

Las células gliales presentes en la corteza cerebelosa de rata aparecen a menudo inmunoteñidas frente a GABA, tanto frente al anticuerpo monoclonal como al policlonal, (Fig. 60). En este sentido, la glía perivascular, asociados íntimamente a la membrana basal que rodea a la pared capilar, también se ha observado inmunopositiva frente a GABA (Figs. 61 y 62), tanto en los capilares que se localizan en la capa molecular como en la granular de la laminilla cerebelosa.

El método indirecto de inmunomarcaje contra GABA nos ha permitido observar, así mismo, reacción positiva en diversas estructuras de naturaleza nerviosa, asociadas al microambiente capilar. El análisis ultraestructural, nos ofrece la posibilidad de observar células grano positivas para ambos antisueros frente a GABA, asociadas a los capilares cerebelosos, separadas en algunos casos por la presencia del envoltorio de naturaleza glial que rodea a los capilares, y en otros casos, asociadas estrechamente al endotelio cerebral (Fig. 62).

Así mismo, dendritas inmunopositivas contra GABA, tanto frente al anticuerpo monoclonal como al policlonal, se han observado en el entorno de los capilares cerebelosos, manteniendo estrecho contacto con la membrana basal que rodea a la pared capilar.

Nuestros estudios nos han permitido poner en evidencia la presencia de terminales axónicos GABAérgicos en el microentorno de los capilares cerebelosos de la rata. Hemos observado terminales axónicos, positivos contra GABA, separados de la pared de los capilares por la presencia del envoltorio glial perivascular (Fig. 63); aunque en muchos de los casos, la glía perivascular aparece sumamente adelgazada y se limita a las dos estructuras de bicapa lipídica de la membrana de la célula glial (Fig. 64). Sin embargo, es posible poner de manifiesto terminales axónicos inmunopositivos contra GABA en contacto íntimo con la membrana basal que se halla rodeando al pericito (Fig. 65), y con la membrana basal que rodea a la propia célula endotelial de los capilares de la corteza cerebelosa de rata (Fig. 66). La reacción positiva aparece como un precipitado denso a los electrones, asociado a las vesículas sinápticas presentes en el terminal axónico.

No hemos observado reacción positiva contra GABA asociada a los elementos celulares descritos anteriormente en ninguno de los controles llevados a cabo de forma paralela; bien sustituyendo los antisueros específicos por suero normal de conejo o ratón (en el caso del anticuerpo policlonal y monoclonal

respectivamente), omitiendo el antisuero específico, o bien utilizando los antisueros preadsorbidos previamente con el antígeno correspondiente (GABA).

## **8.- INMUNOLocalIZACIÓN DE GAD:**

La inmunolocalización de GAD, usando el antisuero policlonal contra GAD, en dilución 1:200, coincide a microscopía óptica, con la observada para GABA. Se observa inmunorreacción positiva alrededor de las células de Purkinje, y en el citoplasma de diversas estirpes celulares, células Golgi y grano, presentes en ambas capas de la laminilla cerebelosa.

Así mismo resulta posible observar tinción inmunopositiva frente a GAD en el endotelio de los capilares cerebelosos, tanto en la capa molecular, granular (Fig. 68), en la capa de las células de Purkinje (Fig. 67) y en la sustancia blanca bajo la corteza cerebelosa.

Es posible advertir la presencia de citoplasmas celulares en estrecho contacto con la membrana basal de los capilares, o prolongaciones celulares que alcanzan a los capilares cerebelosos y que resultan inmunopositivos contra GAD (Figs. 69 y 70).

Sin embargo, sólo las técnicas inmunohistoquímicas aplicadas a la localización ultraestructural, nos permiten distinguir la naturaleza de las estructuras celulares que aparecen en asociación con los capilares y reconocer las características exactas de tal asociación.



La utilización de las técnicas de inmunomarcaje indirecto (PAP) contra GAD, aplicadas a la microscopía electrónica, nos permiten poner de manifiesto la presencia de inmunopositividad contra GAD en los distintos componentes que forman parte de la barrera hematoencefálica en los capilares de la corteza cerebelosa.

La glía astrocitaria existente en la corteza cerebelosa aparece a menudo inmunoteñida contra GAD. El producto de inmunorreacción aparece distribuido de forma homogénea por todo el citoplasma de la célula glial (Fig. 71). La glía perivascular que se encuentra en estrecho contacto con la membrana basal que rodea al pericito (Fig. 80) o a la propia célula endotelial (Figs. 72 y 77), aparece, así mismo, frecuentemente inmunoteñida frente al antisuero policlonal contra GAD. El marcaje inmunohistoquímico aparece a modo de un precipitado denso electrónicamente y distribuido de forma homogénea en el citoplasma celular y en las prolongaciones gliales que alcanzan a los capilares de la corteza cerebelosa.

A menudo, la célula endotelial que constituye la pared de los capilares de la corteza cerebelosa de rata, aparecen inmunomarcadas positivamente contra GAD (Fig. 73). La reacción se advierte bien distribuida homogéneamente en el citoplasma endotelial o bien asociada a las numerosas estructuras vesiculares que pueden ponerse de manifiesto en el citoplasma de la célula endotelial.

El envoltorio glial que rodea la membrana basal de los capilares, no constituye una vaina continua, sino que su presencia se interrumpe para permitir que diversas estructuras de naturaleza nerviosa puedan entrar en contacto con la membrana basal que rodea a los diversos componentes de la barrera hematoencefálica.

En estrecho contacto con la membrana basal que rodea a los elementos vasculares de la corteza cerebelosa, hemos advertido la presencia de diversas estirpes celulares de naturaleza nerviosa inmunopositivas frente a GAD. En este sentido, en la capa granular se observan células grano, inmunopositivas contra GAD asociadas a los capilares sanguíneos (Fig. 74). En la capa molecular cerebelosa, el análisis ultraestructural revela la existencia de células Cesto (Fig. 75) y células estrelladas (Fig. 76), inmunopositivas ambas frente a GAD, y asociadas estrechamente a la membrana basal que rodea a los capilares cerebelosos.

Reacción positiva contra el antisuero anti-GAD hemos observado en citoplasmas dendríticos que aparecen estrechamente asociados a la membrana basal que rodea a la pared capilar (Figs. 77 y 78). La reacción aparece distribuida de forma homogénea en el citoplasma de la dendrita, y particularmente intensa alrededor de las mitocondrias.

El análisis a microscopía electrónica del inmunomarcaje contra GAD revela, así mismo, reacción positiva en terminaciones

axónicas que aparecen en el entorno de los capilares, generalmente separados de la pared vascular por la presencia del envoltorio glial perivascular (Fig. 79). Sin embargo el análisis permite poner en evidencia terminales axónicos positivos frente a GAD en estrecho contacto con la membrana basal que rodea a los elementos vasculares de la corteza cerebelosa, (Figs. 80 y 81). El producto de la inmunotinción se observa asociado a las vesículas sinápticas del terminal axónico.

No se observa inmunorreacción positiva frente al antisuero policlonal contra GAD, en ninguno de los controles llevados a cabo paralelamente; sustituyendo el antisuero específico por suero normal de conejo u omitiendo el antisuero específico.

### 9.- INMUNOLOCALIZACIÓN DE TAURINA:

El método de inmunomarcaje indirecto del PAP, utilizando diluciones 1:100 y 1:200 del antisuero policlonal comercial anti-aurina, revela a microscopía óptica que la reacción inmunocitoquímica se localiza principalmente en soma de las células de Purkinje que limitan las capas granular y molecular. Este intenso marcaje inmunopositivo se observa, así mismo, en el árbol dendrítico apical que asciende a través de la capa molecular de la laminilla cerebelosa (Fig. 82).

Se observa reacción positiva en las células endoteliales de los vasos que irrigan la corteza cerebelosa, tanto en la capa molecular como en la granular, e incluso en la sustancia blanca subyacente (Fig. 83).

A microscopía óptica hemos advertido la presencia de inmunorreacción positiva en estructuras celulares adosadas estrechamente a la pared de los capilares cerebelosos (Fig. 84), cuya naturaleza no es posible determinar con la microscopía de luz.

La utilización de las técnicas inmunohistoquímicas indirectas del PAP, aplicadas a la microscopía electrónica, nos permite, por una parte, comprobar los resultados obtenidos en las técnicas de microscopía óptica y por otra parte, aportar otras nuevas consideraciones al estudio de la localización de aurina

en el cerebelo.

Los estudios ultraestructurales nos han permitido evidenciar inmunorreacción positiva para taurina en el citoplasma (Fig. 85) y las dendritas de las células de Purkinje (Fig. 86), hechos ya observados en el análisis a microscopía de luz. El producto del inmunomarcaje se observa a modo de granulado denso electrónicamente y homogéneo en todo el curso apical del penacho dendrítico.

Así mismo, hemos advertido marcaje inmunopositivo contra taurina en las fibras musgosas que constituyen las aferencias cerebelosas, y en los axones de Golgi que constituyen parte del glomérulo cerebeloso multisináptico, (Figs. 87, 88 y 89). El marcaje inmunohistoquímico se muestra muy patente, denso a los electrones y asociado principalmente a las vesículas sinápticas y a la membrana externa de las mitocondrias presentes en los terminales axónicos.

Los distintos componentes que forman parte de la barrera hematoencefálica, en la corteza cerebelosa de rata son ricos en taurina. Nuestras observaciones nos permiten poner de manifiesto la presencia de marcaje inmunopositivo contra taurina en el citoplasma de la propia célula endotelial, en los capilares presentes en la capa molecular (Fig. 90), granular (Fig. 91) y los presentes en la sustancia blanca sobre la que descansa la laminilla cerebelosa. En todos los casos la reacción contra taurina se muestra a modo de precipitado denso a los electrones,

distribuido de forma homogénea a lo largo del delgado citoplasma endotelial.

En algunos casos es posible observar terminaciones axónicas en estrecho contacto con la pared capilar inmunopositiva frente a taurina.

Así mismo, el estudio ultraestructural nos permite poner en evidencia inmunomarcage positivo contra taurina en la glía perivascular que rodea a la membrana basal de la pared capilar y abraza a los vasos sanguíneos cerebelosos, (Figs. 92 y 93). La reacción se observa principalmente distribuida por todo el citoplasma glial, pero concentrada particularmente alrededor de las mitocondrias y otros sistemas de endomembranas. A menudo, la glía perivascular inmunopositiva frente a taurina, no forma un envoltorio continuo alrededor de los capilares, y permite con ello, que elementos de naturaleza nerviosa puedan entrar en estrecho contacto con la pared vascular (Fig. 93).

Dado que el envoltorio glial perivascular no es del todo continuo, es posible poner de manifiesto citoplasmas dendríticos inmunopositivos frente al antisuero anti-taurina y que se hallan en estrecha asociación con la membrana basal que rodea a la pared vascular, (Fig. 94). El producto de la inmunorreacción aparece a modo de precipitado denso a los electrones y distribuido de forma homogénea a lo largo del citoplasma dendrítico.

Aunque en la corteza cerebelosa, los axones inmunomarcados para taurina son escasos, el exhaustivo análisis ultraestructural nos ha permitido la oportunidad de poner de manifiesto terminales axónicos taurinérgicos. Observamos terminales axónicos taurinérgicos haciendo sinápsis con células Golgi (Fig. 89) y otros terminales que se hallan en estrecha asociación con la membrana basal que rodea a los componentes vasculares, célula endotelial y pericito; aunque en su mayoría aparecen separados de los capilares por el envoltorio glial (Fig. 95). En ambos casos el producto de la inmunotinción se observa asociado tanto a las vesículas sinápticas como a la membrana mitocondrial externa de estos orgánulos celulares presentes en las terminaciones axónicas.

En ninguno de los controles realizados de forma paralela, se ha observado reacción positiva asociada a los elementos cerebelosos descritos anteriormente; bien sustituyendo el antisuero específico por suero normal de conejo, omitiendo el antisuero específico, o bien preadsorbiendo este previamente con taurina purificada comercial.

#### 10.- INMUNOLOCALIZACIÓN DE GLICINA:

La aplicación de las técnicas inmunohistoquímicas del PAP, utilizando diluciones de 1:100 y 1:200 del antisuero policlonal anti-glicina permite observar a microscopía óptica inmunotinción positiva en el cono axonal de las células de Purkinje, así como rodeando al soma de dicha estirpe celular. Es posible observar inmunomarcaje positivo, frente a este antisuero, en las células endoteliales de los capilares presentes en la corteza cerebelosa (Fig. 96a), así como en células cerebelosas que se hallan asociadas estrechamente al microambiente de los capilares (Fig. 96b).

La determinación de la naturaleza de las estructuras inmunopositivas frente a glicina que se hallan en relación con el microambiente capilar ha sido posible gracias a la aplicación de las técnicas inmunohistoquímicas al nivel de la microscopía electrónica.

Ultraestructuralmente podemos poner de manifiesto reacción positiva frente a glicina en el citoplasma de las células endoteliales de los capilares cerebelosos, presentes tanto en la capa granular como molecular de la laminilla (Fig. 97). El marcaje se revela a modo de un precipitado denso electrónicamente y distribuido alrededor de las numerosas vesículas y orgánulos presentes en el citoplasma endotelial.



La células gliales y sus prolongaciones que se encuentran rodeando a la membrana basal que encierra a los capilares cerebelosos, aparecen a menudo inmunopositivas frente a glicina. Este marcaje se observa tanto en los capilares presentes en la capa molecular (Figs. 98 y 99), en los existentes en la capa granular (Fig. 100), y en aquellos presentes en la sustancia blanca que subyace a la laminilla cerebelosa (Fig. 101). La reacción aparece distribuida de forma homogénea a lo largo de las proyecciones gliales, así como asociada a los haces de gliofilamentos presentes en el citoplasma glial.

La vaina glial perivascular que rodea a los capilares cerebelosos, se interrumpe, perdiendo su continuidad, para permitir con ello que elementos de naturaleza nerviosa puedan entrar en contacto con los elementos vasculares. En relación con este hecho, la técnica de inmunomarcaje indirecto del PAP contra glicina, nos ha permitido poner de manifiesto la existencia de citoplasmas dendríticos, inmunopositivos contra glicina, asociados a la membrana basal que rodea a la pared vascular (Fig. 102). En estos elementos nerviosos, el precipitado denso a los electrones que revela la positividad en la inmunorreacción aparece distribuido homogéneamente a lo largo de la dendrita. Es posible, así mismo, poner de manifiesto la existencia de terminaciones axónicas positivas para glicina, que aunque en mayor proporción se pueden observar cercanos a los elementos vasculares, pero separados de estos por la envuelta glial (Fig. 103), resulta posible observarlas en estrecho contacto con la membrana basal que rodea a la pared capilar. En ellas, el

producto de la inmunorreacción aparece asociado a las vesículas sinápticas presentes en el terminal.

Las reacciones, realizadas como control del estudio, implicaron la sustitución del antisuero específico por un suero normal de conejo, la omisión del antisuero específico, y la utilización de un antisuero específico preadsorbido previamente con glicina purificada. En estas reacciones control realizadas de forma paralela, no se ha observado ninguna reacción inmunopositiva en los elementos vasculares, gliales y de naturaleza nerviosa descritos con anterioridad.

### 11.- INMUNOLocalIZACIÓN DE SEROTONINA:

El estudio de la inmunolocalización de serotonina a microscopía óptica se ha realizado utilizando la técnica del inmunomarcaje indirecto del PAP, utilizando el antisuero policlonal contra serotonina en dilución 1:200. El análisis no ha permitido observar marcaje positivo en gran número de capilares presentes en la corteza cerebelosa, siendo el inmunomarcaje de los capilares más numeroso en aquellos presentes en la capa granular (Fig. 104). Así mismo, resulta posible demostrar la presencia de prolongaciones de células gliales, positivas frente a serotonina, alcanzando a los capilares cerebelosos, al igual que prolongaciones celulares cuya naturaleza no puede precisarse a microscopía de luz.

El análisis de la localización ultraestructural de serotonina, utilizando así mismo, el método del inmunomarcaje indirecto, nos permite poner de manifiesto, la presencia de inmunorreacción positiva en el citoplasma de gran número de células endoteliales (Fig. 105). Este marcaje se ha observado principalmente asociado a las numerosas vesículas y orgánulos citoplásmicos presentes en el delgado citoplasma endotelial.

Como ya se había observado a microscopía óptica, el estudio ultraestructural corrobora la existencia de gran número de proyecciones gliales inmunopositivas frente a serotonina, rodeando a los capilares cerebelosos, tanto en los presentes en

la capa molecular, como en la capa granular (Figs. 106 y 107). El producto de la inmunorreacción se observa en gran medida con una distribución homogénea en el citoplasma glial, pero parece asociarse principalmente a los haces de gliofilamentos y a los sistemas de endomembranas presentes en las prolongaciones gliales.

El análisis a microscopía electrónica permite poner de manifiesto la existencia de somas neuronales inmunopositivos frente a serotonina, asociados estrechamente a la membrana basal que rodea a la pared capilar, en los que el precipitado denso que revela el marcaje contra dicho neurotransmisor, aparece distribuido de forma homogénea a lo largo del citoplasma neuronal (Fig. 108).

Dado que el envoltorio glial perivascular no constituye una vaina continua, el análisis ultraestructural de inmunolocalización nos ha permitido poner de manifiesto la existencia de terminaciones axónicas, inmunopositivas frente al anticuerpo contra serotonina, en estrecho contacto con la pared de los capilares cerebelosos (Fig. 109). En este caso el producto de la inmunorreacción que revela la presencia del neuromediador aparece asociado a las vesículas sinápticas presentes en el terminal axónico.

En los distintos controles llevados a cabo paralelamente, y en los que se utilizó suero normal de conejo en vez del antisuero específico, se omitió este suero específico o

se utilizó el suero específico preadsorbido previamente con serotonina purificada, no se observó reacción positiva en los elementos vasculares de la corteza cerebelosa, ni en los elementos gliales y nerviosos asociados a la pared capilar evidenciados en las reacciones no control.

## 12.- INMUNOLOCALIZACIÓN DE TIAMINA:

La utilización de la técnica inmunohistoquímica del PAP se ha realizado utilizando diluciones 1:200 y 1:500 del antisuero policlonal contra Tiamina obtenido en nuestro laboratorio según el protocolo expuesto previamente en el apartado de material y métodos.

A microscopía óptica los estudios nos han permitido poner de manifiesto numerosas células endoteliales inmunopositivas frente a nuestro antisuero (Fig. 110), tanto en los capilares presentes en la capa molecular como granular de la corteza cerebelosa de la rata.

A nivel ultraestructural podemos poner de manifiesto reacción inmunopositiva frente a Tiamina en el citoplasma de las células endoteliales de numerosos capilares cerebelosos, independientemente de su ubicación en la laminilla cerebelosa (Figs. 111 y 112). A pesar de que la reacción inmunocitoquímica se presenta como un precipitado denso a los electrones distribuida de forma homogénea a lo largo del citoplasma endotelial, podemos observar la asociación de este producto de la inmunorreacción con los orgánulos y las numerosas vesículas presentes en el citoplasma endotelial (Fig. 111).

Las células gliales y sus prolongaciones que alcanzan a rodear la membrana basal que limita la pared capilar aparecen

a menudo inmunopositivas frente al antisuero policlonal contra Tiamina. La reacción inmunocitoquímica aparece distribuida de forma homogénea a lo largo del citoplasma glial (Fig. 113).

El envoltorio glial que se halla rodeando a los capilares cerebelosos no constituye una vaina continua, sino que su presencia se interrumpe en algunos puntos, permitiendo que numerosas estructuras de naturaleza nerviosa puedan entrar en contacto con los elementos vasculares que constituyen la barrera hematoencefálica.

El análisis ultraestructural nos ha permitido poner de manifiesto la existencia de citoplasmas dendríticos inmunopositivos frente al antisuero contra tiamina, en estrecha asociación con la membrana basal que rodea a la pared capilar (Fig. 114). La reacción se observa a modo de precipitado denso a los electrones y con una disposición homogénea a lo largo de la dendrita.

Así mismo, el exhaustivo análisis a microscopía electrónica de las estructuras nerviosas asociadas a la pared vascular, no ha permitido demostrar la existencia de algunos terminales axónicos, positivos frente a nuestro antisuero y asociados estrechamente a la pared de los capilares cerebelosos (Fig. 115). En este sentido, el producto de la inmunorreacción aparece asociado a las vesículas presentes en el terminal.

La realización de los pertinentes controles

inmunocitoquímicos, llevados a cabo de forma paralela, permitió poner de manifiesto la falta de reacción positiva en los elementos celulares descritos anteriormente. Estos implicaron la substitución del antisuero específico por suero normal de conejo, la omisión del antisuero específico y la substitución del antisuero específico por el antisuero C.



### 13.- INMUNOLocalIZACIÓN DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASA:

La técnica de inmunomarcaje indirecto se ha llevado a cabo utilizando en método del PAP, con diluciones 1:200 y 1:500 del antisuero policlonal específico contra AAT obtenido en nuestro laboratorio, según el protocolo ya mencionado previamente en el apartado de material y métodos.

A microscopía óptica, el análisis permite demostrar la existencia de citoplasmas endoteliales inmunopositivos frente a nuestro antisuero (Fig. 116), así como en prolongaciones celulares que alcanzan la pared de los vasos y cuya naturaleza exacta, sólo es posible determinar mediante la aplicación de las técnicas a la microscopía electrónica.

El análisis a microscopía electrónica de la distribución del inmunomarcaje en la corteza cerebelosa de la rata, nos ha permitido poner de manifiesto reacción positiva frente a este antisuero en el citoplasma de numerosas células endoteliales que forman parte de los capilares sanguíneos, tanto en la capa granular como molecular. La inmunorreacción se observa bajo dos aspectos. En primer lugar, hemos observado en numerosos capilares cerebelosos marcaje inmunopositivo en el citoplasma endotelial que se encuentra adosado a la porción luminal de la membrana plasmática (Fig. 118). En otros capilares cerebelosos, la reacción inmunológica aparece distribuida de forma homogénea en todo el espesor del citoplasma endotelial (Fig. 117), y

asociada a las numerosas estructuras de naturaleza vesículas presentes en el endotelio capilar.

En numerosos capilares cerebelosos, independientemente de su localización en una o otra capa de la laminilla cerebelosa, el análisis ultraestructural revela inmunotinción positiva en las prolongaciones gliales que alcanzan la membrana basal que rodea a la pared capilar (Fig. 119). A pesar de que el precipitado denso que revela la reacción antígeno-anticuerpo se muestra distribuido de forma homogénea a lo largo del citoplasma glial, resulta posible observar la inmunorreacción asociada a los haces de gliofilamentos.

El método de inmunomarcaje indirecto contra AAT nos ha permitido observar, así mismo, reacción positiva en diversas estructuras de naturaleza nerviosa asociadas estrechamente al microambiente capilar, ya que la glía perivascular no constituye un envoltorio totalmente continuo. En este sentido, el análisis ultraestructural permite poner de manifiesto terminaciones dendríticas inmunopositivas frente al antisuero contra AAT asociadas al microambiente de los capilares cerebelosos. En muchos de los casos, entre el elemento de naturaleza nerviosa y los componentes vasculares es posible destacar la presencia de la glía perivascular interpuesta (Fig. 120); sin embargo, también es posible poner de manifiesto citoplasmas dendríticos positivos frente al antisuero contra AAT en estrecho contacto con la membrana basal que rodea a los capilares cerebelosos (Figs. 121 y 122).

Nuestros estudios han permitido poner en evidencia la presencia de terminales axónicos positivos contra AAT en el microentorno de los capilares cerebelosos, asociados estrechamente a la membrana basal que rodea la pared de los capilares sanguíneos (Fig. 123). El marcaje inmunopositivo se observa como un precipitado denso electrónicamente asociado a las vesículas sinápticas presentes en el terminal axónico.

No hemos observado reacción positiva contra AAT asociada a ninguno de los elementos celulares descritos anteriormente en ninguno de los diferentes controles llevados a cabo paralelamente, bien substituyendo el antisuero específico por tampón fosfato (0.1M, pH=7.4), substituyéndolo por suero normal de conejo, o bien por suero anti-AAT preadsorbido con cantidad suficiente de AAT para inhibir la reacción inmunocitoquímica.

#### 14.- INMUNOLOCALIZACIÓN DE Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa:

La utilización de la técnica inmunohistoquímica del PAP aplicada a la microscopía electrónica, se ha realizado utilizando la dilución 1:5 del antisuero policlonal contra la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>.

Nuestras observaciones nos han permitido poner de manifiesto reacción positiva frente al antisuero en el citoplasma de numerosas células endoteliales de los capilares cerebelosos, tanto en los presentes en la capa molecular, en la granular y en la sustancia blanca subyacente. La reacción se observa a modo de precipitado denso electrónicamente y asociado de forma exclusiva a la membrana luminal de las células endoteliales (Fig. 125).

No hemos observado reacción positiva en las células endoteliales de los capilares cerebelosos, en ninguno de los controles llevados a cabo de forma paralela; bien substituyendo el antisuero específico por suero normal de conejo o bien omitiendo dicho antisuero.

### **15.- INMUNOLOCALIZACIÓN DE FOSFOCREATINA:**

El método de inmunomarcaje indirecto del PAP se ha llevado a cabo utilizando diluciones 1:200 y 1:500 del antisuero policlonal contra fosfocreatina, obtenido en nuestro laboratorio según el protocolo mencionado anteriormente en el apartado de material y métodos.

El análisis ultraestructural nos ha permitido poner de manifiesto la presencia de inmunorreacción positiva contra este antisuero en el citoplasma de numerosas células endoteliales que forman parte de los capilares sanguíneos, tanto en los presentes en la capa molecular en la capa granular, como en aquellos presentes en la sustancia blanca subyacente (Figs. 126, 127, 128, 129 y 130). A pesar de que principalmente este producto de inmunorreacción aparece como un precipitado denso electrónicamente y distribuido homogéneamente a lo largo de todo el citoplasma endotelial, resulta posible observarlo asociado a la cara citoplásmica de la membrana mitocondrial externa (Fig. 129) y a las numerosas vesículas que se hallan presentes en el interior del citoplasma de la célula endotelial (Fig. 130).

Así mismo, hemos advertido la existencia de marcaje inmunopositivo contra este antisuero policlonal frente a fosfocreatina en las algunas prolongaciones de citoplasmas gliales que se encuentran asociadas a la membrana basal que rodea la pared de los capilares cerebelosos (Fig. 131). En este caso,

el producto de la reacción inmunológica aparece también distribuido de forma homogénea a lo largo del citoplasma glial.

El análisis ultraestructural no ha revelado reacción positiva contra fosfocreatina asociada a los elementos celulares descritos anteriormente en ninguno de los controles llevados a cabo de forma paralela; bien substituyendo el antisuero específico por suero normal de conejo, o bien omitiendo el antisuero específico.

## **16.- INMUNOLOCALIZACIÓN DE CLATRINA:**

Las técnicas inmunohistoquímicas del PAP aplicadas a la localización de moléculas semejantes a clatrina en la corteza cerebelosa, se han aplicado utilizando la dilución 1:40 del antisuero policlonal contra clatrina desarrollado en cabra. A microscopía óptica, el marcaje aparece de forma patente en el citoplasma de las células de Purkinje (Fig. 132). Así mismo, resulta posible observar inmunomarcaje positivo en el citoplasma de algunas de las células endoteliales que tapizan los capilares de la corteza cerebelosa (Fig. 133).

Para poder revelar la naturaleza exacta de las estructuras inmunopositivas a clatrina en el entorno de los capilares, resulta imprescindible la aplicación de las técnicas de inmunomarcaje indirecto del PAP aplicadas al análisis ultraestructural.

La microscopía electrónica nos permite poner de manifiesto la presencia de evidente inmunomarcaje positivo en la porción luminal de la célula endotelial de gran número de capilares presentes en la corteza cerebelosa (Fig. 134). En el citoplasma endotelial, hemos observado, la presencia de vesículas de pinocitosis inmunopositivas frente a clatrina, de forma que el producto de la inmunorreacción aparece asociado a la cara externa de sus membranas, (Fig. 135).

Las células astrogliales perivasculares, que emiten sus prolongaciones para abrazar a los capilares presentes en la corteza cerebelosa, se observan frecuentemente inmunopositivas frente a clatrina (Figs. 136 y 137). El producto denso a los electrones que demuestra la presencia de moléculas semejantes a clatrina, aparece distribuido de forma homogénea a lo largo del citoplasma astrogliar; aunque a veces pueden formarse pequeños acúmulos bajo la cara citoplásmica de la membrana glial que se encuentra en contacto con la membrana basal que rodea a la pared capilar (Fig. 137).

La vaina glial perivascular, no resulta ser un envoltorio continuo, de forma que es posible observar algunas discontinuidades, que, aunque no muy numerosas, permiten el establecimiento de puntos de contacto entre los elementos vasculares que forman parte de la pared capilar y los diversos constituyentes de la corteza cerebelosa. En este sentido, en el análisis de la distribución de la inmunorreactividad a clatrina, hemos podido poner de manifiesto somas que corresponden a células de Purkinje, inmunopositivos frente al antisuero anti-clatrina, en estrecho contacto con la membrana basal que rodea a la pared capilar, (Fig. 137). La inmunorreacción aparece asociada principalmente a las numerosas estructuras endomembranosas que se encuentran en el citoplasma celular.

En numerosas dendritas presentes en la capa molecular del cerebelo, hemos podido poner de manifiesto inmunopositividad a clatrina (Fig. 138). La reacción aparece asociada a numerosas



estructuras de naturaleza vesicular presentes en el citoplasma dendrítico. En relación con los capilares cerebelosos, se han observado dendritas inmunopositivas frente al antisuero anti-clatrina, pero no asociadas estrechamente a la pared vascular, sino separadas de la membrana basal por una delgada lámina correspondiente a glia perivascular (Fig. 139).

En la corteza cerebelosa aparecen también terminaciones axónicas positivas a clatrina (Fig. 140). El producto de la inmunorreacción que demuestra la presencia de moléculas semejantes a clatrina, aparece asociado a las vesículas sinápticas presentes en el terminal. El análisis ultraestructural nos permite poner de manifiesto reacción positiva frente a clatrina asociada a terminaciones axónicas que se encuentran en estrecha asociación con la membrana basal que rodea a los elementos que constituyen la pared capilar, (Fig. 141). La reacción inmunopositiva se puede observar localizada en pequeños acúmulos formados en la cara citoplásmica de la membrana de la terminación axónica que aparece en contacto con la membrana basal de la pared vascular.

En las reacciones control llevadas a cabo de forma paralela, y que implicaron la sustitución del antisuero específico por suero normal de cabra y la omisión del antisuero específico, no se observó inmunorreacción alguna en ninguno de los elementos vasculares, gliales y nerviosos demostrados en las reacciones no control.

### 17.- INMUNOLOCALIZACIÓN DE $\alpha$ -ACTINA:

Las técnicas inmunohistoquímicas del PAP aplicadas a la microscopía óptica, utilizando dilución 1:200 del antisuero monoclonal contra  $\alpha$ -actina revelan marcaje positivo muy patente alrededor de las células de Purkinje, correspondiendo a la glial de Bergmann que rodea a esta población neuronal (Fig. 142). Aunque de manera mucho menos evidente, es posible observar marcaje contra  $\alpha$ -actina en algunos tipos celulares en la laminilla cerebelosa, pero cuya naturaleza no es posible determinar a ciencia cierta con la microscopía óptica.

El análisis permite observar, así mismo, inmunorreacción positiva frente al anticuerpo monoclonal contra  $\alpha$ -actina en el endotelio de gran número de capilares cerebelosos y en su microambiente vascular (Fig. 143), distinguiéndose fibras y prolongaciones celulares positivas frente a este antisuero que alcanzan el microentorno de los capilares cerebelosos, pero que sólo el posterior análisis ultraestructural permitirá discernir la naturaleza exacta de tales estructuras.

La observación a microscopía electrónica de la distribución del marcaje inmunopositivo frente al antisuero monoclonal contra  $\alpha$ -actina permite demostrar la presencia del producto de la inmunorreacción en el citoplasma endotelial de gran número de capilares cerebelosos (Figs. 144 y 145), tanto en los presentes en la capa molecular, granular, como en los que se

ubican en la capa de las células de Purkinje. La reacción aparece revelada en forma de precipitado denso a los electrones situado principalmente alrededor de las numerosas vesículas y orgánulos presentes en el citoplasma endotelial. A menudo estas vesículas, inmunopositivas contra  $\alpha$ -actina, pueden observarse asociadas a la membrana abluminal de la célula endotelial. Es posible observar inmunorreacción contra  $\alpha$ -actina, alrededor de cuerpos de estructura vesicular presentes tanto en el citoplasma endotelial como en el pericito (Fig. 146).

El análisis ultraestructural permite corroborar las observaciones realizadas a microscopía óptica. Los astrocitos perivasculares, que se hallan rodeando la membrana basal de los vasos cerebelosos, aparecen frecuentemente inmunopositivos frente a  $\alpha$ -actina (Figs. 148, 149, 155 y 156). La inmunorreacción aparece distribuida homogéneamente a lo largo de las prolongaciones astrogliales que alcanzan los vasos, sin embargo, resulta frecuente observar el producto de la inmunorreacción asociado a los haces de gliofilamentos, la membrana externa de las mitocondrias, el abundante sistema de endomembranas y formando pequeños acúmulos en la cara citoplásmica de la membrana plasmática que se halla en contacto con la membrana basal de la pared vascular (Figs. 148, 149 y 155).

La glía cerebelosa de Bergmann, que se halla rodeando a las células de Purkinje y las cestas, aparece a menudo inmunopositiva frente a  $\alpha$ -actina (Figs. 150, 151 y 152). Al igual que se observa en el caso de la glía astrocitaria, en la de

Bergmann el producto de la inmunorreacción positiva aparece tanto distribuido de forma homogénea a lo largo del citoplasma, como asociado a los numerosos orgánulos citoplásmicos presentes. Frecuentemente podemos poner de manifiesto la presencia de células de la glial de Bergmann inmunopositivas frente a  $\alpha$ -actina, rodeando los capilares cerebelosos presentes en esta zona de las células de Purkinje (Fig. 152).

En la capa molecular, frecuentemente la glía cerebelosa que se halla rodeando los elementos presináptico y postsináptico, aparece fuertemente inmunopositiva frente al antisuero monoclonal contra  $\alpha$ -actina (Fig. 154).

Como ya se había intuido en las observaciones a microscopía óptica, el análisis ultraestructural permite poner de manifiesto neuronas estrelladas inmunopositivas frente a  $\alpha$ -actina (Fig. 153), acumulándose el producto de la inmunorreacción preferentemente en las zonas postsinápticas. A pesar de que aparecen estas células cercanas a los elementos vasculares, el análisis permite hacer constar la presencia de glía perivascular interpuesta entre los somas neuronales inmunopositivos frente a este antisuero monoclonal y la membrana basal que se halla rodeando a la pared vascular.

En la corteza cerebelosa resulta frecuente demostrar la presencia de citoplasmas dendríticos inmunopositivos frente a  $\alpha$ -actina. En relación con los elementos vasculares que irrigan la corteza, la mayoría de las dendritas positivas aparecen

separadas del capilar por la presencia de glía astrocitaria interpuesta; sin embargo, es posible poner de manifiesto la existencia de dendritas positivas frente al antisuero anti- $\alpha$  actina, asociados a la membrana basal que rodea la pared capilar (Fig. 155). En ambos casos, el producto de la inmunorreacción que revela la presencia de  $\alpha$ -actina, aparece asociado principalmente a los neurotúbulos, la membrana externa de las mitocondrias y la cara citoplásmica de la membrana plasmática.

En estrecha asociación con la membrana basal que se encuentra rodeando a la pared capilar, es posible poner de manifiesto la presencia de terminaciones axónicas inmunoteñidas frente a anti- $\alpha$  actina. En este caso, el marcaje se observa a modo de precipitado denso a los electrones y asociado a las vesículas sinápticas presentes en la terminación (Fig. 156).

En los controles realizados de forma paralela, que implicaron la sustitución del antisuero específico por suero normal de ratón y la omisión del antisuero específico, no se observó reacción positiva alguna en los elementos vasculares. gliales y nerviosos descritos anteriormente.

**V.- DISCUSIÓN.**

### 1.- Barrera hematoencefálica: ultraestructura y presencia de moléculas con actividad funcional.

Es un hecho conocido que los capilares cerebrales constituyen la principal estructura morfológica responsable de la formación de la barrera hematoencefálica. Sin embargo, los capilares cerebrales están implicados en un gran número de importantes funciones metabólicas y de transporte que pueden resultar igualmente importantes para el funcionamiento cerebral.

El encéfalo se mantiene separado del resto del organismo gracias no sólo a una separación espacial, sino también a través de los complejos mecanismos bioquímicos y fisiológicos que constituyen la barrera hematoencefálica.

La barrera hematoencefálica representa realmente un sistema celular complejo. Pese a que principalmente la estructura encargada del establecimiento de la barrera puede situarse a nivel de las células endoteliales (Brightman, 1977), existen otras estructuras y estirpes celulares que pueden contribuir de forma trascendental a la formación, inducción y mantenimiento de la barrera hematoencefálica. La membrana o lámina basal, los pericitos y las células de la glía perivascular constituyen estos elementos.

### 1.1. Células endoteliales:

Las células endoteliales de los capilares cerebelosos constituyen células con características únicas, comparándolas con las que integran cualquier otro endotelio vascular. Son células típicamente polarizadas, sus bordes aparecen sellados íntimamente. De acuerdo con estudios previos en capilares cerebrales (Reese et al., 1960; Reese & Karnowski, 1967; Brightman & Reese, 1969; Betz et al., 1980; Nagy et al., 1984; Burns, 1989) este precintado celular está representado por la presencia de las uniones estrechas interendoteliales, las cuales, permiten el establecimiento y mantenimiento de microdominios de membrana diferentes entre las regiones luminal y abluminal de la célula endotelial. Según estudios realizados con técnicas de criofractura (Connel & Mercer, 1974; Dertmietzel, 1975; Shivers, 1979; Nagy et al., 1984) estas uniones aparecen anastomosadas, continuas y carentes de uniones «gap». Esta regionalización de la membrana conduce a la formación de un auténtico tejido epitelial polarizado, y es la base estructural de las importantes propiedades bioquímicas y funcionales que caracterizan el mantenimiento de la barrera hematoencefálica. En este sentido, la aplicación de las técnicas inmunohistoquímicas nos ha permitido poner de manifiesto, en discrepancia con diversos autores (Firth, 1977; Betz et al., 1980; Vorbrodt, 1982; Inomata et al., 1984; Kato & Nakamura, 1987; Latker et al., 1987) la presencia de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en la porción luminal de la membrana de las células endoteliales de los capilares cerebelosos



de la rata. Nuestros resultados están, sin embargo, de acuerdo con los trabajos previos de Vorbrodt & Trowbridge (1991b). La ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , importante transportador iónico, implicado en el mantenimiento del gradiente de concentraciones de iones a través de la membrana y conservador de su potencial eléctrico (Darnell et al., 1988), constituye un interesante marcador de membrana en células típicamente polarizadas. Gracias a la implicación de esta enzima en el mantenimiento del gradiente iónico, es interesante su localización en relación con los procesos de transporte a través de la misma.

El diámetro capilar ronda los 2-4  $\mu\text{m}$ ; sin embargo, la superficie celular en contacto con el medio sanguíneo circulante se ve fuertemente incrementada debido a la presencia de las abundantes microvellosidades de aspecto digitiforme que se proyectan hacia la luz del capilar. En la bibliografía consultada no se hace referencia alguna a la presencia de estas proyecciones citoplásmicas que podrían resultar de gran importancia funcional como medio para incrementar la superficie de absorción a través de la región luminal de la membrana plasmática endotelial.

La abundancia de atributos citoplásmicos en las células endoteliales da cuenta de la elevada actividad que estas células mantienen al servicio del correcto mantenimiento de las características específicas de la barrera hematoencefálica. Los sistemas de endomembranas, retículo endoplasmático y complejo de Golgi, se presentan altamente desarrollados, reflejando con ello la alta actividad celular. Según la mayoría de los autores (Reese

et al., 1967; Westergaard & Brightman, 1973; Brightman, 1977) la escasez de vesículas de pinocitosis constituye una de las características más importantes de estas células. Nuestros estudios a microscopía electrónica nos han permitido, sin embargo, poner de manifiesto un número considerablemente elevado de vesículas de pinocitosis, bien distribuidas en el citoplasma endotelial o bien asociadas a las membranas luminal y abluminal de la célula endotelial. Estas observaciones parecen estar más de acuerdo con las consideraciones de Lossinsky et al. (1970), quienes incluso plantean la existencia de una red túbulo-vesicular en el citoplasma endotelial. Esta observación morfológica está relacionada con un elevado índice de transporte de sustancias que son necesarias para el funcionamiento cerebral. La gran variabilidad en estructura y contenido de estas estructuras vesiculares puede dar cuenta de la diversidad en la naturaleza de las sustancias transportadas a través de la barrera hematoencefálica. Estas observaciones se ven reforzadas con nuestros estudios inmunocitoquímicos que nos han permitido poner de manifiesto la presencia de moléculas semejantes a clatrina en el interior del citoplasma de las células endoteliales y alrededor de las numerosas vesículas membranosas presentes en el citoplasma endotelial. Estos hechos están de acuerdo con nuestra sugerencia de que en la pared de los capilares cerebelosos debe existir un transporte de moléculas en el que deben estar implicados procesos de endocitosis. Nuestra observación ultraestructural de moléculas semejantes a  $\alpha$ -actina asociadas a las vesículas membranosas presentes en las células endoteliales sugiere la implicación de estas moléculas en los

procesos de transporte en la pared de los capilares cerebelosos. Existen estudios previos sobre capilares cerebrales que demuestran la presencia de moléculas de naturaleza contráctil intervienen en los procesos de pinocitosis (Crowther et al., 1975; Pearse, 1976; LeBeux & Willemot, 1978; De Robertis & De Robertis, 1983; Izumi et al., 1991). Así mismo en relación con las numerosas vesículas membranosas, nuestras observaciones inmunocitoquímicas han puesto en evidencia la presencia de moléculas semejantes a fosfocreatina, molécula importante como reservorio de grupos fosfato activos que pueden jugar un papel importante en los numerosos procesos de fosforilación presentes en la célula endotelial y que intervienen en los procesos de contracción en los que están implicadas proteínas de naturaleza contráctil. Investigaciones previas han demostrado que la fosfocreatina interviene de forma activa en la contracción celular. En relación con ello, podría considerarse que la presencia de fosfocreatina y de moléculas semejantes a  $\alpha$ -actina en la pared de las vesículas de pinocitosis apoyaría la hipótesis de la intervención de estas moléculas en los procesos de transporte a través de los capilares cerebelosos.

La abundancia de mitocondrias observada en nuestro análisis ultraestructural, ha sido referida por diversos autores (Burns et al., 1970, 1981, 1983) y constituye un importante reflejo de las cuantiosas implicaciones energéticas necesarias para el mantenimiento de las características propias de la barrera hematoencefálica. En este sentido cabe destacar los trabajos realizados por Fernández et al. (1983) en los que se describe una

disposición peculiar de las crestas mitocondriales en la glía que se halla envvolviendo los capilares cerebrales.

#### 1.2.- Membrana basal:

En los capilares cerebelosos la membrana basal aunque patente, a menudo se observa sumamente adelgazada, no pudiendo caracterizarse en todos los casos como la estructura trilaminar característica descrita por Perlmutter et al. (1990, 1991). Pese a ello, su presencia es constante rodeando a las células vasculares. Se han propuesto diversas funciones en relación con la representación de la membrana basal, así se sabe de su implicación en procesos de adhesión celular (Martínez-Hernández & Amenta, 1983; Garbisa & Negro, 1984; Aumalley & Timpl, 1986; Lein et al., 1991), de su intervención como filtros selectivos del medio cerebral (Van Deurs, 1976), como promotores de la neuritogénesis (Lander et al., 1982, 1985a, 1985b; Edgar et al., 1984; Dow et al., 1988; Lein et al., 1991), e incluso se ha propuesto que la membrana basal ejerce alguna función sobre las diversas funciones de las células endoteliales (Goldstein & Bezt, 1983; Goldtein et al., 1986) controlando en alguna medida las funciones de la barrera hematoencefálica.

### 1.3.- Pericitos:

Como ya se ha descrito previamente (Tilton, 1991), los pericitos mantienen con la región abluminal de la célula endotelial una estrecha relación estructural. A pesar de que en todas las secciones histológicas no siempre están presentes estas células en relación con la pared capilar, según diversos autores (Simionescu et al., 1988) su representación es más patente en los capilares del tejido nervioso, comparándolos con los de cualquier otro endotelio microvascular. En este sentido, parece ser que en el sistema nervioso los pericitos desarrollan funciones específicas (Krause et al., 1988; Risau et al., 1990). Los bordes de los pericitos aparecen unidos a menudo mediante la formación de uniones estrechas, hecho que puede estar en relación con un fortalecimiento de los mecanismos de barrera presentes en las células endoteliales. Los abundantes orgánulos citoplásmicos son un reflejo de la elevada actividad de esta estirpe celular: las mitocondrias y los sistemas de endomembranas aparecen altamente desarrollados. La abundancia de estructuras de naturaleza lisosomal de aspecto polimórfico corrobora el papel fagocítico propuesto para los pericitos (Maxwell & Kruger, 1965; Cancilla et al., 1972; Kristensson & Olsson, 1973; Mato et al., 1980; Sims, 1986). Incluso más recientemente se ha demostrado que los pericitos comparten determinantes antigénicos con macrófagos (Graeber et al., 1989).

Nuestras observaciones a microscopía electrónica, de acuerdo con las de otros autores (Cuevas et al., 1984; Larson et al., 1987), han permitido poner en evidencia la presencia de uniones «gaps» entre los pericitos y las células endoteliales de los capilares cerebelosos. Esta observación ultraestructural fundamenta el concepto de una auténtica coordinación de las funciones de ambos tipos celulares al servicio del correcto funcionamiento de los capilares cerebrales.

La presencia de numerosas estructuras vesiculares, de tamaño y aspecto morfológico variados, cimenta nuestra hipótesis de la implicación de estas células en los procesos de transporte que se producen en ambas direcciones entre el medio sanguíneo circulante y el cerebral. Estas observaciones se ven así mismo corroboradas por nuestra localización inmunocitoquímica de moléculas semejantes a  $\alpha$ -actina asociadas a estas estructuras vesiculares presentes en los pericitos, puesto que es bien conocido el papel de la  $\alpha$ -actina en los procesos de transporte transcelular (De Robertis & De Robertis, 1983).

Además de estas implicaciones funcionales, en la bibliografía existente, se han sugerido otras funciones que ensalzan el papel de los pericitos en el sistema nervioso (Díaz-Florez et al., 1991), como prestar servicio en el soporte mecánico de la pared capilar (Rhodin, 1968; Courtoy & Boyles, 1983), poseer capacidad para contribuir en la síntesis de la membrana basal (Cohen et al., 1980; Stram et al., 1987), y tener capacidad de convertirse en células de la microglía (Kosunen et

al., 1963; Maxwell & Kruger, 1965; Mori & Leblond, 1969; Baron & Gallego, 1972; Boya, 1976; Peters et al., 1976; Jordan & Tomas, 1988; Graeber et al., 1989). Así mismo, estas células pueden experimentar procesos de contracción celular (Rouget, 1873, 1879; Vimtrup, 1922; Zimmermann, 1923; Bensley & Vimtrup, 1928; Krogh, 1929), hipótesis corroborada posteriormente con la demostración inmunocitoquímica de moléculas implicadas en procesos de contracción celular:  $\alpha$ -actina (Owman et al., 1977; Chan et al., 1986; Skalli et al., 1989), tropomiosina (Joyce et al., 1985a) e isomiosina (Joyce et al., 1985b). Estas observaciones apoyan el concepto de la implicación de los pericitos en la modulación del flujo sanguíneo en el sistema nervioso (Herman & Jacobson, 1988) de acuerdo con las necesidades cerebrales, integrando la información desde el tejido nervioso y traduciéndola en los consiguientes ajustes del flujo sanguíneo capilar.

En relación con las funciones de la barrera hematoencefálica se ha sugerido que los pericitos son capaces de modular la permeabilidad vascular (Miller & Sims, 1986), debido a que los pericitos son capaces de informar a las células endoteliales de la liberación desde el tejido nervioso de sustancias neurotransmisoras y neuromoduladoras (Sheridan & Larson, 1982; Cuevas et al., 1984; Larson et al., 1987). En esta línea, los pericitos pueden ejercer una importante función como intermediario entre las necesidades requeridas por el tejido nervioso y las funciones realizadas por las células endoteliales.

#### 1.4.- Glía perivascular:

Las células gliales que emiten sus prolongaciones abrazando a los capilares cerebrales presentan características propias de células muy activas: retículo endoplásmico y complejo de Golgi muy desarrollados y mitocondrias numerosas y de gran tamaño. En relación con la estructura de las mitocondrias gliales cabe destacar los curiosos estudios llevados a cabo por Fernández et al. (1983). Las membranas de las prolongaciones gliales que alcanzan la pared vascular se unen mediante la formación de uniones estrechas (Suárez-Nájera et al., 1980); sin embargo diversos autores (Stensaas & Stensaas, 1968) han demostrado que el espacio intercelular es permeable y deja pasar las diversas sustancias que han conseguido atravesar el endotelio vascular. Se ha sugerido que las prolongaciones gliales que recubren la pared capilar pueden jugar algún papel en el ajuste, mantenimiento y regulación de la permeabilidad de los capilares cerebrales, bien actuando sobre las uniones estrechas interendoteliales, o bien a través de un control más fino sobre las diversas actividades físico-químicas de los componentes vasculares (Goldstein, 1988). Sin embargo, a pesar de que se desconocen los mecanismos a través de los cuales la glía es capaz de ejercer este control, se sabe que está implicada en otras importantes funciones que afectan a la barrera hematoencefálica. En esta línea, se ha demostrado el papel de la glía en la inducción y mantenimiento de la polaridad endotelial (Debault & Cancilla, 1980; Beck et al., 1984), papel que es compartido



también con señales procedentes del tejido nervioso. Se sabe que las células de la glía perivascular juegan un importante papel en el mantenimiento de las uniones estrechas interendoteliales (Stewart & Wiley, 1981; Tao-Chen et al., 1986, 1987; Arthur et al., 1987).

Se ha propuesto que la glía perivascular controla además, durante el desarrollo cerebral, los procesos de endocitosis y el transporte transendotelial (Bertossi et al., 1991). Este papel puede estar confirmado con nuestros estudios inmunocitoquímicos que demuestran la presencia de moléculas semejantes a clatrina en las proyecciones gliales que abrazan a los capilares cerebelosos.

Nuestras observaciones inmunocitoquímicas a microscopía electrónica han puesto de manifiesto la presencia en estas prolongaciones gliales de moléculas semejantes a  $\alpha$ -actina y fosfocreatina. La inmunolocalización revela que las moléculas semejantes a  $\alpha$ -actina en los astrocitos perivasculares se disponen formando pequeños acúmulos bajo la membrana plasmática glial que se mantiene en contacto con la pared vascular, aunque también hemos puesto de manifiesto moléculas contráctiles en las células de la glía de Bergmann que a menudo pueden rodear a la pared vascular. Estas observaciones relacionan a los elementos gliales con posibles mecanismos de contracción celular a través de los cuales sería posible también modular o controlar el flujo sanguíneo cerebral.

La envoltura glial constituida por las prolongaciones de los astrocitos no forma una vaina totalmente continua alrededor de la pared vascular; aunque los capilares cerebelosos están en su mayor parte rodeados por estas proyecciones, existen algunos puntos de discontinuidad. Según los estudios de Pardridge (1991), las prolongaciones gliales cubren algo más del 95% de la superficie abluminal de la pared vascular. Ello significa que, al menos en un 5% de esta superficie abluminal, es posible poner de manifiesto relación morfológica estrecha entre las diversas estructuras de naturaleza nerviosa y la membrana basal que rodea a la pared de los capilares, tanto a nivel del pericitio como de la propia célula endotelial.

Aunque tradicionalmente no se consideraba la existencia de una inervación de los capilares cerebrales, y se pensaba que los distintos metabolitos originados como consecuencia de la actividad neuronal actuaban como reguladores del tono vascular (Roy & Sherrington, 1890), diversos investigadores (Fox & Raichle, 1986; Siver, 1978) observaron que el aumento del flujo sanguíneo se producía en una proporción mayor que el incremento del metabolismo. Ello implica por lo tanto, que la existencia de un sólo mecanismo homeostático no resulta suficiente para explicar el acoplamiento entre la actividad neuronal y los ajustes del flujo sanguíneo vascular en el sistema nervioso central (Lou & Edvinsson, 1989).

Nuestros estudios a microscopía electrónica en secciones de corteza cerebelosa nos han permitido poner de manifiesto la

relación entre distintos elementos de naturaleza nerviosa y los capilares cerebelosos. En su mayoría, los elementos nerviosos aparecen separados de la pared capilar por la presencia de la glía interpuesta; sin embargo, es posible observar componentes nerviosos en contacto íntimo con la membrana basal que rodea a la pared capilar.

En la capa granular ha sido posible observar citoplasmas neuronales de células grano y células Golgi, en contacto estrecho con la membrana basal. Así mismo, han sido observados terminaciones axónicas y citoplasmas dendríticos en asociación con el microambiente capilar, manteniendo con la pared de los capilares cerebelosos una relación de íntima asociación. En esta misma línea, en la capa granular se advierten numerosas fibras musgosas aferentes y axones de células de Golgi en estrecho contacto con la pared de los capilares.

En la capa de las células de Purkinje hemos puesto de manifiesto células de Purkinje y axones de células cesto en contacto íntimo con la membrana basal que rodea a la pared de los capilares.

En la capa molecular, también resulta posible revelar la presencia de componentes de naturaleza nerviosa en contacto con los elementos vasculares. Tanto citoplasmas de células estrelladas como de células cesto pueden observarse en estrecho contacto con la pared vascular. Además, se han podido advertir axones de fibras paralelas y dendritas, en estrecho contacto con

la pared de los capilares cerebelosos.

Es un hecho comprobado que las células gliales contienen receptores para diversos neuromediadores (Bockaert & Ebertsolt, 1988; Bowman & Kimelberg, 1988; Hösli & Hösli, 1988; Kettenmann et al., 1988; Villegas et al., 1988; Walz, 1988; Whitaker-Azmitia, 1988 y Wilkin & Cholewinski, 1988) y sustancias neuroactivas (gliotransmisores), de forma que estas células son capaces de responder a la liberación nerviosa de neuromediadores in vivo e in vitro en respuesta a estimulaciones específicas (Bodega et al., 1989; Martin et al., 1988, 1989; Hertz, 1989). En este sentido, a través de la liberación de gliotransmisores, la glía perivascular es capaz de actuar sobre el restablecimiento y el ajuste de las diversas funciones en las que está implicada la barrera hematoencefálica. La glía perivascular puede, por lo tanto, ser capaz de acoplar las necesidades del tejido nervioso con las concomitantes respuestas funcionales de los elementos de la barrera hematoencefálica.

### 1.5.- Componentes nerviosos relacionados con los capilares cerebelosos:

La relación anatómica entre elementos de naturaleza nerviosa y los componentes vasculares, demostrada en nuestros estudios ultraestructurales en la corteza cerebelosa de la rata, apoyan el concepto de una regulación dinámica del funcionamiento y de las propiedades de la barrera hematoencefálica, de acuerdo con las demandas fisiológicas que supone la actividad cerebral normal. Esta observación había sido sugerida por diversos autores (Lou & Edvinsson, 1989); sin embargo, la posible acción de los componentes nerviosos sobre los componentes vasculares había sido puesta en duda por objeciones tales como la ausencia de contactos sinápticos entre terminaciones axónicas y vasos. A pesar de ello, la existencia de un control de la permeabilidad y del flujo sanguíneo local, a través de terminaciones axónicas, es un hecho aceptado actualmente (Hardebo & Owman, 1980; Goldstein & Betz, 1983; Reiss, 1984; Kobayashi et al., 1985; Palmer, 1986a; Pardridge, 1988; Lou & Edvinsson, 1989; Palmer et al., 1989; Sarmiento et al., 1991) a pesar de que son escasas las observaciones de terminaciones axónicas sobre la pared de los capilares (Rennels & Nelson, 1975; Suddith et al., 1980).

En la corteza cerebelosa, los capilares que bañan el tejido no solo mantienen estrecho contacto con terminaciones axónicas de origen diverso, fibras musgosas, axones de células Golgi y cesto, sino que también ha sido demostrada en nuestros estudios

la estrecha relación entre la pared vascular y otros elementos de naturaleza nerviosa, citoplasmas dendríticos y somas de las diversas estirpes neuronales que componen la corteza cerebelosa, células grano, células Golgi, células de Purkinje, estrelladas y cesto.

La presencia en las prolongaciones dendríticas y somas neuronales de diversas sustancias de carácter neuromediador (neurotransmisores y neuromoduladores), y las enzimas implicadas en su síntesis, ha conducido a diversos grupos de investigadores a proponer la existencia de una liberación extrasináptica de los diversos neuromedidores (Hadju et al., 1973; Magistretti & Morrison, 1975; Geffen, 1976; Beudet & Descarries, 1978; Martínez-Rodríguez et al., 1992, 1993). Extrapolando estas consideraciones, puede pensarse en la acción de las terminaciones dendríticas y somas neuronales que mantienen con la pared vascular una estrecha relación anatómica. Nuestra observación ultraestructural puede representar, por lo tanto, el reflejo morfológico de la influencia de los circuitos neuronales del propio sistema nervioso central sobre los diversos aspectos de la función cerebrovascular, modificando tanto el flujo sanguíneo como la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Rennels & Nelson, 1975; Swanson et al., 1977; Suddith et al., 1980; Alborch, 1981; Rennels et al., 1983).

Aunque realmente no se han observado contactos sinápticos entre los elementos nerviosos y la pared vascular, la inmunolocalización referida en el apartado de resultados, de

moléculas semejantes a  $\alpha$ -actina y clatrina, en los diversos elementos nerviosos relacionados con la pared vascular, corrobora la liberación de las sustancias neuromediadoras desde estos compartimientos nerviosos, puesto que diversos investigadores sostienen el papel de estas moléculas en la liberación axonal (Goud et al., 1991; Linstedt & Kelly, 1991; Su et al., 1991; Yoshimi et al., 1991).

La célula endotelial es capaz de responder a las estimulaciones específicas procedentes tanto del tejido nervioso directamente como a través de la glía perivascular, ya que han sido demostrados bioquímicamente en la pared de los vasos receptores para las diferentes sustancias neuromediadoras. En este sentido, han sido localizados receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos (Herbs et al., 1979; Friedman & Davis, 1980; Nathanson, 1980; Peroutka et al., 1980; Harik et al., 1981; Kobayashi et al., 1981), receptores dopaminérgicos  $D_2$  (Baca & Palmer, 1978; Peroutka et al., 1980; Palmer et al., 1989), receptores serotoninérgicos (Reinhard, 1979), receptores histamínicos (Joó et al., 1975; Karnushina, 1980; Gross et al., 1981; Dux & Joó, 1982), receptores GABAérgicos (Mirzoyan & Akopyan, 1967; Krause et al., 1980; Rausch et al., 1983; Alborch et al., 1984), receptores para hormona paratiroidea (PTH) y VIP (Karnushina et al., 1982; Amenta et al., 1991), receptores muscarínicos (Grammas et al., 1983), receptores purinérgicos (Huang & Drumond, 1979; Schutz et al., 1982; Edvinsson et al., 1983; Hardebo et al., 1987; Kalaria & Harik, 1988; Boeynaems & Pearson, 1990).

A pesar de que la función de los capilares cerebrales parece estar regulada tanto por el tejido nervioso como por las células gliales perivasculares, los posibles mecanismos por los que se regula la función capilar no se conocen completamente. Uno de tales mecanismos parece ser la vía de la fosforilación de proteínas en la célula endotelial. Se ha demostrado bioquímicamente que estos procesos de fosforilación tienen lugar principal o casi exclusivamente en la membrana plasmática endotelial (Pardridge et al., 1985).

Nuestras investigaciones han revelado la presencia de moléculas semejantes a fosfocreatina en el citoplasma de los capilares cerebelosos. Distintos estudios han localizado moléculas semejantes a fosfocreatina en el sistema nervioso (Yoshimine et al., 1984; Kato et al., 1986), habiéndose observado que la actividad creatina-kinasa está relacionada con receptores de diversa naturaleza (Barrantes et al., 1985; Jingu et al., 1986). La presencia de moléculas semejantes a fosfocreatina en el citoplasma de las células endoteliales, debido a su implicación en procesos de fosforilación como importante reservorio de grupos fosfato activos, sugiere su implicación en el control del flujo vascular. Ello tiene una particular trascendencia puesto que, de acuerdo con los estudios de LeBeux & Willemot (1978) y Owman et al. (1977), nuestros estudios inmunohistoquímicos han puesto de manifiesto la presencia de moléculas semejantes a  $\alpha$ -actina en el citoplasma de las células endoteliales de los capilares cerebelosos.



## 2.- Neuromediadores y enzimas en la Barrera-Hematoencefálica y su microambiente:

### 2.1.- Acido $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y Glutámico decarboxilasa (GAD):

El GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) es el neuromediador más ampliamente distribuido en el sistema nervioso, con una acción principalmente inhibidora de las vías nerviosas centrales.

El método inmunohistoquímico del PAP nos ha permitido demostrar la presencia de inmunorreactividad positiva a GABA en diversos componentes de la barrera hematoencefálica. La glutamato decarboxilasa (GAD) es la enzima limitante en la síntesis de este neuromediador (McGeer & McGeer, 1989). Por ello su localización inmunohistoquímica puede ser utilizada como un marcador específico de componentes que sintetizan GABA (McGeer & McGeer, 1975, Martínez-Rodríguez et al., 1993).

En estudios previos usando vasos cerebrales aislados (Edvinsson & Mackenzie, 1977; Edvinsson & Krause, 1979; Anwar & Mason, 1982; Edvinsson et al., 1982; Kelly & McCulloch, 1982; Antonaccio, 1984; Suzuki et al., 1984) se sugirió la acción directa del GABA sobre el sistema vascular cerebral, independientemente de su bien conocida acción como neuromediador inhibidor. Los experimentos llevados a cabo in vivo con gatos han demostrado que el GABA produce, de forma dosis-dependiente, la dilatación de vasos cerebrales, efecto que es bloqueado

específicamente por picrotoxinina y bicuculina (Fujiwara et al., 1975; Edvinsson & Krause, 1979). Las respuestas vasculares al GABA parecen limitarse a la circulación cerebral, ya que los efectos vasculares mediados por este neuromediador no se han detectado in vitro en vasos periféricos (Krause et al., 1980).

Diversos estudios bioquímicos han demostrado la presencia de receptores GABAérgicos en los vasos cerebrales (Mirzoyan & Akopyan, 1967; Krause et al., 1980; Rausch et al., 1983; Alborch et al., 1984), los cuales parecen mediar la vasodilatación cerebral originada por el ácido  $\gamma$ -aminobutírico. Sin embargo, hasta ahora no se habían demostrado inervación GABAérgica directa de los vasos cerebrales.

Nuestros resultados proporcionan clara evidencia que demuestra la relación morfológica íntima entre elementos inmunopositivos frente a GABA y GAD y la membrana basal que rodea a la célula endotelial y al pericito.

Hemos puesto de manifiesto reacción positiva tanto frente a GABA como a GAD en las prolongaciones de la glía perivascular. La presencia de GABA en las células gliales podría representar la captación del neurotransmisor desde los espacios intersticiales, importante función de la glía observada a nivel de la hendidura sináptica (Henn & Hamberger, 1971; Hansson et al., 1985); sin embargo, la presencia de la enzima GAD en estas prolongaciones gliales que rodean a los capilares cerebelosos implica que las células gliales son capaces de sintetizar GABA.

Es un hecho bien conocido (Bockaert & Ebertsolt, 1988; Bowman & Kimelberg, 1988; Hösli & Hösli, 1988; Kettenmann et al., 1988; Villegas et al., 1988; Walz, 1988; Whitaker-Azmitia, 1988 y Wilkin & Cholewinski, 1988) que las células gliales contienen receptores y sustancias neuroactivas, de forma que son capaces de responder a la liberación neuronal de neuromediadores in vitro liberando sustancias neuroactivas que se han considerado gliotransmisores, en respuesta a estimulaciones específicas (Bodega et al., 1989; Martín et al., 1988). De acuerdo con ello, la liberación glial de GABA puede estar implicada en la regulación de las propiedades de la barrera hematoencefálica, puesto que se ha demostrado, como ya se ha mencionado previamente, el efecto vasodilatador del GABA.

Hemos observado así mismo, la presencia tanto de GABA como de la enzima implicada en su síntesis, la GAD, en el interior del citoplasma de las células endoteliales de los capilares cerebelosos. La presencia de GABA puede representar el posible transporte transendotelial de este aminoácido; sin embargo, la presencia de GAD en estas células implica que el GABA puede ser sintetizado por las propias células endoteliales. Esta observación coincide con la de estudios bioquímicos e inmunohistoquímicos previos utilizando células endoteliales aisladas (Mirzoyan et al., 1970; Hamel et al., 1983; Imai et al., 1991). Se ha sugerido (Kuriyama et al., 1970; Mirzoyan et al., 1970) que este GABA de origen endotelial actúa sobre receptores GABAérgicos cerebrovasculares de la misma forma que lo hace el GABA extraendotelial. Puesto que existen estudios que demuestran

el papel de las células endoteliales en la regulación del flujo vascular (Furchgott & Zawadzki, 1980; Lee, 1980), este mecanismo podría contribuir a la regulación del tono vascular cerebral.

Nuestras investigaciones utilizando el método inmunohistoquímico del PAP nos ha permitido poner de manifiesto, así mismo, la presencia de GABA y GAD en diversos componentes de naturaleza nerviosa que se hallan en contacto íntimo con la membrana basal que rodea a los capilares cerebelosos, independientemente de su localización en la laminilla cerebelosa. En este sentido, hemos demostrado la presencia de GABA y GAD en somas neuronales, citoplasmas dendríticos y terminaciones axónicas asociadas a la pared vascular.

Habiéndose demostrado la existencia de una liberación extrasináptica de neuromediadores desde somas neuronales y citoplasmas dendríticos (Hadju et al., 1973; Magistretti & Morrison, 1975; Geffen, 1976; Beudet & Descarries, 1978; Martínez-Rodríguez et al., 1992, 1993), la liberación de GABA desde los componentes nerviosos , axonales y no-axonales, representa el reflejo morfológico del control nervioso de la actividad cerebrovascular.

Aunque gran parte de los componentes nerviosos inmunopositivos para GABA y GAD aparecen separados de los constituyentes de la barrera hematoencefálica por la presencia de la glía interpuesta, existen sin embargo componentes nerviosos en asociación íntima con la pared vascular. Además, como se ha

mencionado previamente, se ha demostrado que las células gliales son capaces de responder a las diversas estimulaciones procedentes del tejido nervioso, pudiendo de esta forma actuar como intermediarios entre las señales nerviosas y los ajustes originados en las propiedades de la barrera hematoencefálica.

Estos estudios inmunocitoquímicos demuestran la estrecha relación entre diversos componentes de naturaleza glial y nerviosa, capaces de contener y sintetizar GABA, en relación con la pared capilar. Por ello, sugerimos que los efectos reguladores del GABA sobre la circulación cerebral, tanto en condiciones normales como patológicas (Welch et al., 1975; Achar et al., 1976) pueden estar mediados por esta relación morfológica.

## 2.2.- Ácido 2-aminoetanosulfónico: taurina.

La taurina, el ácido 2-aminoetanosulfónico, es un compuesto simple de naturaleza ubicua. En contraste con su limitada distribución en los tejidos vegetales (Jacobsen et al., 1968), la taurina aparece ampliamente distribuida en el reino animal (Fürth, 1903).

La taurina es uno de los principales constituyentes del pool de aminoácidos libres presentes en el sistema nervioso central de todos los mamíferos (Perry et al., 1979). En el cerebro maduro, su concentración es sólo superada por la de ácido glutámico (Sturman et al., 1978), alcanzando valores de 1-40 mM (Mandel & Pasantes-Morales, 1978; Pasantes-Morales, 1978; Oja &

Kontro, 1983). A pesar de ello, durante el desarrollo cerebral, constituye el aminoácido libre presente en mayor concentración (Sturman et al., 1990).

La taurina ha sido considerada un neurotransmisor o neuromodulador inhibitor, ya que ejerce una acción inhibidora sobre la actividad neuronal en muchas regiones del sistema nervioso central (Guidotti, 1972; Haas et al., 1973; Kuriyama et al., 1978; McBride & Frederickson, 1980; Wright et al., 1986; Oja & Kontro, 1987, 1990). La taurina incrementa la hiperpolarización nerviosa a través de un aumento del flujo de  $\text{Cl}^-$  a la célula (Curtis & Johnston, 1974; Okamoto et al., 1983; Huxtable, 1989, 1990).

La corteza cerebelosa es particularmente rica en taurina (Collins & Topiwala, 1974) y contiene células que se supone utilizan taurina específicamente como neuromediador, las células estrelladas (McBride et al., 1976; Frederickson et al., 1978; Yarbrough et al., 1981; Okamoto et al., 1983a, 1983b). Tanto la taurina como la principal enzima que participa en su síntesis, la cisteina sulfinato decarboxilasa (CSDC), han sido detectadas inmunohistoquímicamente en la corteza cerebelosa (Chan-Palay, 1982a, 1982b; Ottersen, 1988; Madsen et al., 1985, 1990a, 1990b).

Nuestros estudios inmunohistoquímicos, de acuerdo con los estudios bioquímicos previos (Collins & Topiwala, 1974) demuestran que la corteza cerebelosa es rica en taurina. Conforme

a los estudios de Madsen et al. (1985) y Ottersen (1988) en las células de Purkinje la taurina es particularmente abundante, concentrándose este aminoácido primordialmente en el soma neuronal y en las dendritas. Según los estudios de este investigador, todos los tipos y prolongaciones celulares cerebelosos contienen taurina, a excepción de las fibras musgosas. Nuestros resultados han demostrado la presencia de fibras musgosas positivas para taurina, corroborando la amplia distribución de este aminoácido sulfónico en la corteza cerebelosa de la rata. Según Agrawal et al. (1971) la fracción mitocondrial es rica en taurina, pero estos resultados de localización subcelular parecen ser contradictorios y pueden estar relacionados con la distinta metodología empleada para poner de manifiesto la presencia de taurina. Muchos autores han empleado la inmunorreactividad a CSDC como marcador (Chan-Palay et al., 1982a, 1982b, Taber et al., 1986); sin embargo esta inmunodetección conduce a la formación de bandas sagitales caracterizadas por la intensa inmunorreacción de las células de Purkinje. La distinta distribución de Taurina y CSAD puede ser un reflejo de la baja producción de taurina en cerebro (Jacobsen et al., 1964; Sturman et al., 1970a, 1970b; Rassin & Gaull, 1975; Gaull et al., 1977; Knopf et al., 1978) y más bien parece depender de procesos de difusión de este aminoácido (Sturman et al., 1985; Cavallini et al., 1976).

En contra de las observaciones previas de ciertos investigadores (Lake & Verdone-Smith, 1990) las técnicas inmunocitoquímicas nos han permitido poner de manifiesto la

presencia de taurina en el citoplasma de las células endoteliales de los capilares de la corteza cerebelosa de la rata. Esta taurina presente en los vasos puede estar en relación con una modulación de las funciones de la barrera hematoencefálica. Se ha propuesto que la taurina en el sistema nervioso, además de su papel como neuromediador, ejerce una importante función como agente estabilizador de las membranas en virtud de su interacción con los fosfolípidos, modificando con ello la conductancia iónica (Nakashima et al., 1982; Alvarez et al., 1983; Huxtable, 1981, 1986, 1990). En este sentido, su presencia en numerosos capilares cerebelosos puede estar relacionada con la alteración de la conductancia iónica de la membrana, cuyo valor resulta muy bajo en condiciones normales (Crone, 1986a).

Diversas investigaciones neurofisiológicas han propuesto para la taurina un importante papel en procesos de osmoregulación en el sistema nervioso (Pasantes-Morales & Schousboe, 1988; Wade et al., 1988; Pasantes-Morales et al., 1990a, 1990b; Pasantes-Morales & Martín del Río, 1990; Pazdermik et al., 1990; Sanchez-Olea & Pasantes-Morales, 1990), pudiendo contribuir a los ajustes de volumen en las células endoteliales necesarios para el correcto acoplamiento del flujo sanguíneo.

Se ha demostrado además que la taurina es un importante regulador de procesos  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes, inhibiendo la actividad protein kinasa dependiente de calmodulina (Huxtable, 1990; Schaffer et al., 1990; Li & Lombardini, 1991), modulando el transporte de ATP dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Huxtable, 1990). A través



de esta importante función de la taurina sobre los procesos de fosforilación, y debido a la presencia en las células endoteliales de moléculas semejantes a fosfocreatina y a  $\alpha$ -actina ya descritas anteriormente, la taurina podría ejercer cierto control sobre el flujo sanguíneo vascular.

En los diferentes elementos perivasculares de naturaleza diversa, las técnicas inmunohistoquímicas han permitido demostrarnos la presencia de taurina asociada directamente con la pared vascular.

Parece ser que la taurina ejerce su función a través de su interacción con un receptor específico (López-Colomé, 1982; Wu et al., 1990), modulando alostéricamente los lugares de unión de los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> (Horikoshi et al., 1988; Kontro et al., 1990; Kontro & Oja, 1990; Quin, 1990; Bureau & Olsen, 1991), o bien a través de la interacción con receptores de glicina (Horikoshi et al., 1988; Schmieden et al., 1992). En la bibliografía consultada no se han descrito receptores específicos para taurina en la pared de los vasos cerebrales; sin embargo, sí se han descrito la presencia en la pared vascular de receptores GABAérgicos (Mirzoyan & Akopyan, 1967; Krause et al., 1980; Rausch et al., 1983; Alborch et al., 1984) a través de los cuales la taurina extraendotelial podría ejercer sus efectos. Recientes investigaciones han demostrado un efecto vasodilatador de la taurina (Nakagawa et al., 1990; Ristori & Verdeti, 1991).

La presencia de taurina en células gliales es un hecho

descrito previamente (Martin & Shain, 1979, 1986; Storm-Mathisen & Ottersen, 1986). Se sabe que las células gliales presentan sistemas de recaptación de taurina de alta afinidad (Kaczmarek & Davison, 1972; Lahdesmaki & Oja, 1973; Lahdesmaki et al., 1975; Borg et al., 1976; Korpi & Oja, 1983; Shain & Martin, 1990) y dependiente de Na<sup>+</sup> (Starr, 1973; Krishna et al., 1978; Lajtha & Sershen, 1975a, 1975b; Okamoto & Namima, 1978; Kontro et al., 1987). Sin embargo, la presencia en las células gliales de la enzima implicada en la síntesis de taurina, la cisteína sulfinato decarboxilasa (Almarghini et al., 1991) y las observaciones de diversos investigadores (Shain & Martin, 1984; ; Holopainen et al., 1985; Pasantes-Morales & Schousboe, 1989; Pasantes-Morales et al., 1990) demuestran que las células gliales son capaces de sintetizar y liberar taurina en respuesta a estimulaciones específicas.

Sólo en el nervio óptico se han descrito proyecciones gliales perivasculares que contienen taurina (Lake & Verdone-Smith, 1990). Nuestras observaciones ultraestructurales demuestran que también en los capilares de la corteza cerebelosa la glía perivascular contiene taurina. Puesto que la taurina ha sido considerada por diversos autores (Martin et al., 1988; Almarghini et al., 1991) como un gliotransmisor, esta observación morfológica puede representar el reflejo anatómico del papel regulador de la taurina desde las prolongaciones gliales.

En estrecha relación con los elementos vasculares hemos observado diversos componentes de naturaleza nerviosa

inmunopositivos a taurina. En estudios previos se habían descrito la presencia de taurina asociada a subpoblaciones específicas de sinaptosomas (Agrawal et al., 1970; Bleeker & Gfeller, 1971; Macaione et al., 1975; Seighart et al., 1976), sin embargo se ha propuesto que el mecanismo de liberación axonal de taurina difiere del de otros neurotransmisores clásicos (Schousboe et al., 1989) ya que las respuestas debidas a taurina varían claramente de aquellas que caracterizan a los neuromedadores conocidos. A pesar de ello, los terminales nerviosos taurinérgicos son escasos en la corteza cerebelosa (Ottersen, 1988). Aquellos que se observan han sido interpretados por Palay & Chan-Palay (1974) como colaterales recurrentes de las células de Purkinje.

Nuestras observaciones ultraestructurales han puesto de manifiesto la presencia de axones taurinérgicos en asociación estrecha con la membrana basal que rodea a los elementos vasculares. Esta relación íntima puede constituir el reflejo morfológico del control nervioso que la taurina puede ejercer sobre las diversas funciones de la barrera hematoencefálica.

### 2.3.- Glicina:

La glicina es, junto con el GABA, un importante neuromediador de caracter inhibitor en la médula espinal, tronco cerebral y retina (Aprison & Daly, 1978; Ottersen & Storm-Mathisen, 1984; Aoki et al., 1988). Este aminoácido está implicado en el funcionamiento de diversos centros sensoriales del

cerebro: sistema visual, sistema olfativo, centros somatosensoriales y áreas de integración sensorial, entre las que se encuentran el cerebelo y el colículo inferior.

Coincidiendo con las observaciones de Pourcho et al (1992) en la corteza cerebelosa, algunas células de Purkinje aparecen inmunomarcadas para glicina. Sin embargo en la bibliografía existente no se hace referencia alguna de la presencia de glicina en relación con los distintos elementos que componen la pared de los capilares cerebrales.

Nuestros estudios inmunocitoquímicos demuestran la presencia de este aminoácido inhibidor en diversos componentes relacionados con la pared de los capilares cerebelosos. En esta línea, hemos observado glicina en el citoplasma de la propia célula endotelial, glía perivascular y elementos de naturaleza nerviosa, axones y citoplasmas dendríticos, asociados estrechamente a la pared vascular.

Numerosos grupos de investigadores han analizado la presencia de receptores de glicina en el sistema nervioso (Frotholm & Rotter, 1985; Araki et al., 1988; Betz, 1991; Naas et al., 1991; Pourcho, 1991; Steitanidou et al., 1991; Yazulla & Studholme, 1991); sin embargo, no se han puesto en evidencia receptores para este aminoácido en la pared de los vasos cerebrales a través de los cuales la glicina podría ejercer su acción. A pesar de ello, se ha demostrado que la glicina puede tener efecto sobre la regulación del tono vascular (Kubo &

Kihara, 1987, 1990; Talman & Robertson, 1989).

La presencia de glicina en elementos gliales y nerviosos que se hallan en estrecho contacto con la membrana basal que rodea a los elementos vasculares, puede representar el reflejo estructural del control que la glicina puede ejercer modulando las funciones de los capilares en la corteza cerebelosa de la rata.

#### 2.4.- Serotonina:

La serotonina (5-hidroxitriptamina) es un compuesto neuroquímico implicado en diversas situaciones de stress y enfermedades neurológicas (Aghajanian, 1978; Essman, 1978; Pappius et al., 1988; Wahl et al., 1988; Kitayama et al., 1989; Burgeois, 1991).

Se sabe que la serotonina produce la contracción de los vasos cerebrales a través de la implicación de receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub> (Grome & Harper, 1983; Edvinsson et al., 1984; Amer et al., 1985; Gaw et al., 1990; Dabire & Richer, 1991); sin embargo a dosis elevadas, la serotonina puede incluso originar la dilatación de los vasos cerebrales, acción que puede llevarse a cabo indirectamente bien a través de la liberación de factores de relajación derivados del endotelio (EDRF<sub>s</sub>) (Cocks & Angus, 1983; Gaw et al., 1990) o bien a través de la liberación de norepinefrina (Edvinsson & Mackenzie, 1977; Marin et al., 1979).

Diversos estudios han demostrado bioquímicamente en la pared de los vasos cerebrales la presencia de receptores para serotonina (Edvinsson & Hardebo, 1976; Edvinsson et al., 1978; Reinhard, 1979; Griffith et al., 1982; Peroutka et al., 1983; Chang & Owman, 1986; Parson et al., 1989).

Se han demostrado inervación serotoninérgica de arterias y arteriolas cerebrales (Reinhard et al., 1979; Edvinsson et al., 1980, 1983; Marco et al., 1985; Bonvento, 1991). En nuestras observaciones ultraestructurales de localización de serotonina en relación con la barrera hematoencefálica hemos observado la presencia de serotonina en diversos elementos de naturaleza glial y nerviosa que se hallan en íntimo contacto con la pared capilar. Teniendo en cuenta la existencia de una liberación de sustancias neuromediadoras no sólo sináptica sino extra-sináptica, esta observación puede constituir el reflejo morfológico de que también en la corteza cerebelosa la serotonina puede jugar algún papel en la regulación de las diversas funciones de la barrera hematoencefálica.

#### 2.5.- Tiamina:

Diversas investigaciones han conducido a pensar que la vitamina hidrosoluble B<sub>1</sub>, la tiamina, puede estar implicada en procesos de neurotransmisión (Swank & Prados, 1942; Dreyfus & Victor, 1961; Victor et al., 1971; Dreyfus, 1976; Cooper & Pincus, 1979; McCandless, 1982). En el hombre, el denominado síndrome de Wernicke-Korsakoff, caracterizado por una pérdida de

memoria y por alteraciones en el comportamiento, se asocia a una deficiencia de tiamina y alteraciones morfológicas en el sistema nervioso central.

Como ya han observado diversos investigadores (Minz, 1938; Von Muralt, 1947; Knyhar and Laszlo, 1973; Csillik et al., 1974; Schoffeniels & Marginenn, 1985; Martínez-Rodríguez et al., 1980, 1989) la tiamina está implicada directamente en la neurotransmisión, bien como un neurotransmisor o bien como un neuromodulador.

La presencia de tiamina en el citoplasma de las células endoteliales, demostrada en nuestras investigaciones inmunohistoquímicas, puede reflejar el transporte transendotelial de vitamina B<sub>1</sub> a través de la barrera hematoencefálica, puesto que se han demostrado bioquímicamente en la pared de las células endoteliales cerebrales transportadores específicos para tiamina (Greenwood et al., 1982).

Según los estudios de Schoffeniels (1985) se ha demostrado que la tiamina está implicada en el control de la conductancia iónica. Este efecto podría ser ejercido también por la tiamina que se halla relacionada con la barrera hematoencefálica.

Por ello la presencia de tiamina demostrada en nuestros estudios ultraestructurales, en los diversos componentes de naturaleza glial y nerviosa, en estrecho contacto con la membrana basal que rodea a la pared vascular, sugiere que en la corteza

cerebelosa la tiamina puede desempeñar algún papel en la modulación de las propiedades de la barrera hematoencefálica.

#### 2.6.- Aspartato aminotransferasa (AATasa):

La aspartato aminotransferasa (AATasa) es una enzima dependiente de piridoxal fosfato, implicada en el metabolismo de los ácidos glutámico y aspártico (Braunstein, 1973). Cataliza una reacción reversible de transferencia de grupos amino en la que intervienen glutamato y aspartato. Como se ha demostrado bioquímicamente en el sistema nervioso central la actividad de la aspartato aminotransferasa está en un 80% implicada en la degradación del ácido glutámico y no toma parte apreciable en la síntesis de este aminoácido (Berl et al., 1970). En este sentido, la localización inmunohistoquímica de la enzima AATasa puede servir como marcador de estructuras que sintetizan y almacenan ácido aspártico (Martínez-Rodríguez et al., 1977; Altschuler et al., 1982; Inagaki et al., 1984).

En cerebelo el ácido aspártico, al igual que el ácido glutámico, juega un importante papel como neurotransmisor excitador (Eccles et al., 1966). Los estudios electrofisiológicos (Curtis et al., 1960; Curtis & Johnston, 1974) han demostrado que el ácido aspártico produce una despolarización reversible asociada a un incremento en la conductancia de la membrana.

En la corteza cerebelosa de la rata nuestras observaciones ultraestructurales han revelado la presencia de la enzima en el



citoplasma de las células endoteliales. Ello implica que las células endoteliales son capaces de sintetizar ácido aspártico, aminoácido que puede desempeñar algún papel en la modulación de las propiedades de la barrera hematoencefálica. Estudios de González & Santos-Benito (1987) y Martínez-Rodríguez et al. (1993) en células endoteliales cerebrales han señalado la presencia de enzimas implicadas en la síntesis de otros neurmediadores, acetilcolina y GABA.

En la corteza cerebelosa de la rata diversos estudios histoquímicos e inmunocitoquímicos han puesto en evidencia la presencia de la aspartato aminotransferasa en sinápsis y células gliales Martínez-Rodríguez et al., 1974, 1976, 1982; Arenas-Díaz & Martínez-Rodríguez, 1990; Westergaard et al., 1991; Wurdig & Kugler, 1991).

Nuestros resultados de localización inmunohistoquímica de la enzima en las proyecciones de la glía perivascular y otros componentes de naturaleza nerviosa, terminaciones axónicas y citoplasmas dendríticos, en estrecho contacto con la membrana basal que rodea a la pared de los capilares cerebelosos, inducen a considerar el papel del ácido aspártico en el control de las funciones de la barrera hematoencefálica. Esta función ha sido referida en estudios realizados en nuestro laboratorio en el núcleo coclear (Martínez-Rodríguez et al., 1993).

**VI.- CONCLUSIONES.**

### **CONCLUSIONES:**

A la vista de los resultados expuestos en esta Tesis, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

**Primera conclusión:** La importancia de los procesos de transporte, a través de mecanismos de pinocitosis, viene representada por la presencia de clatrina y de un número notablemente elevado de vesículas membranosas en el citoplasma de las células endoteliales y en los pericitos, de los capilares de la corteza cerebelosa.

**Segunda conclusión:** La demostración inmunocitoquímica de  $\alpha$ -actina y fosfocreatina en el endotelio de los capilares cerebelosos, revela la importancia de los procesos energéticos y de los fenómenos de contracción celular, como mecanismos de regulación del flujo sanguíneo cerebeloso y de la permeabilidad capilar.

**Tercera conclusión:** La presencia de  $\alpha$ -actina en la glía perivascular sugiere la posible intervención de las células gliales en la regulación del flujo sanguíneo en la corteza cerebelosa a través de mecanismos de tipo contráctil.

**Cuarta conclusión:** La existencia de contactos íntimos entre elementos de naturaleza nerviosa y la membrana basal que rodea a los capilares cerebelosos, nos conduce a sugerir que todas las estirpes neuronales que componen la laminilla cerebelosa pueden contribuir a regular las propiedades de los capilares cerebelosos. Estos contactos constituyen el reflejo morfológico del control nervioso de la circulación sanguínea en el cerebelo.

**Quinta conclusión:** La glía perivascular contiene numerosos neuromediadores (neurotransmisores y neuromoduladores) y algunas de las enzimas implicadas en su síntesis. Por tanto, podemos sugerir que, la presencia de estos neuromediadores en la glía perivascular demostrada inmunocitoquímicamente, puede representar la función de la glía en el ajuste de las propiedades de los capilares cerebelosos, de acuerdo con las demandas requeridas por el tejido nervioso. Así mismo, la glía perivascular actúa como intermediario entre los elementos nerviosos en los que aparecen estos neuromediadores y las concomitantes adaptaciones en el flujo y permeabilidad capilar.

**Sexta conclusión:** La presencia de diversos neuromediadores y de algunas de las enzimas implicadas en la síntesis de los mismos, en componentes de naturaleza nerviosa - somas neuronales, dendritas y terminaciones axónicas - asociadas estrechamente a la membrana basal que rodea a los vasos

sanguíneos, constituye la evidencia morfológica del control nervioso que dichos neuromediadores pueden ejercer sobre la actividad de los capilares cerebelosos y la circulación sanguínea en dicho centro nervioso.

**VII.- BIBLIOGRAFÍA.**

- ACHAR, V.S.; WELCH, K.M.A.; CHABI, E.; BARTOSH, K. y MEYER, J.S. (1976). Cerebrospinal fluid gamma-aminobutyric acid in neurologic disease. *Neurobiol.* 26: 777-780.
- ABBOTT, N.J. (1972). Access of ferritin to the interstitial space of carinus brain from intracerebral blood vessels. *Tissue Cell* 4: 99-104.
- ABBOTT, N.J. y BUNDGAARD, M. (1975). Vascularity and microvessel surface area density in brain and muscle of the cephalopod *Sepia officinalis*. *J. Physiol.* 365: 98.
- ABBOTT, N.J. y TREHERNE, J.E. (1977). Homeostasis of the brain microenvironment: a comparative account. En: «Transport of Ions and water in animals». (B. Gupta, R.B. Moreton, J.L. Oschman y B. Wall, eds). Academic Press, London, pp: 481-510.
- ABBOTT, N.J.; BUNDGAARD, M. y CSERR, H.F. (1986). Comparative physiology of the blood-brain barrier. En: «The blood-brain barrier in health and disease». (A.J. Suckling, M.G. Rumsby y M.W.B. Bradbury, eds). Ellis Horwood Health Science Series. Chichester, England. pp: 52-72.
- AGHAJANIAN, G.W. (1978). Physiology and Pharmacology of central serotonin receptor. En: «Psychopharmacology». (M.A. Lipton, R.Y. Wang, L. DiMascio y K.F. Killam, eds). Raven Press, New York, pp: 171-184.
- AGRAWAL, H.C.; DAVIDSON, A.N. y KACZMAREK, L.K. (1971). Subcellular distribution of taurine and cysteinesulphinate decarboxylase in developing rat brain. *Biochem. J.* 122: 759-763.
- ALBORCH, E. (1981). Cholinergic receptors in the cerebral arteries in the goat. En: «Cerebral microcirculation and metabolism». (J. Cervós-Navarro y E. Frtschka, eds). Raven Press, New York. pp: 285-291.
- ALBORCH, E.; TORREGROSA, G.; TERRASA, J. y ESTRADA, C. (1984). GABA-receptors mediated cerebral vasodilatation in the unanesthetized goat. *Brain Res.* 321: 103-110.
- ALMARGHINI, K.; REMY, A. y TAPPAZ, M. (1991). Immunocytochemistry of the taurine biosynthesis enzyme, cysteine sulphinate decarboxylase, in the cerebellum. Evidence for a glial localization. *Neuroscience* 43 (1): 111-119.
- ALTSCHULER, R.; KUAL, J. y WENTHOLD, R. (1982). Aspartate aminotransferase like immunoreactivity as a marker for aspartate/ glutamate neurons in guinea pig photoreceptors. *Nature* 298: 45-54.
- AMENTA, F. y CAVALOTTI, C. (1991). Vasoactive intestinal polypeptide receptors in rat cerebral vessels: an

- autoradiographic study. *J. Auton. Pharmacol.* 11 (5): 285-293.
- ANDREWS, J.M.; CANCELLA, P.A.; GRIPPO, J. y MENKES, J.H. (1971). Globoid cell Leucodistrophy (Krabbe's disease): Morphological and biochemical studies. *Neurology* 21: 337-352.
- ANGEL, C. (1966) Adrenalectomy, stress and the blood-brain barrier. *Dis. Nerv. Syst.* 27: 389-393.
- ANGEL, C. (1969). Starvation, stress and the blood-brain barrier. *Dis. Nerv. Syst.* 30: 94-97.
- ANTONACCIO, M.J. (1984). Central transmitters: physiology, pharmacology and effects on the circulation. En: «Cardiovascular pharmacology». Second edition. (M.J. Antonaccio, ed). Raven Press, New York. pp: 155-195.
- ANTONELLI-ORLIDGE, A.; SAUNDERS, K.B.; SMITH, S.R. y D'AMORE, P.A. (1989). An activated form of transforming growth factor  $\beta$  is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4544-4548.
- ANWAR, N. y MASON, D.F.J. (1982). Two actions of  $\gamma$ -aminobutyric acid on the responses of the isolated basilar artery from the rabbit. *Brit. J. Pharmacol.* 75: 177-181.
- AOKI, E.; SEMBRA, R.; KEINO, H.; KATO, K. y KASHIWAMATA, S. (1988). Glycine-like immunoreactivity in the rat auditory pathway. *Brain Res.* 442: 63-71.
- APRISON, M.H. y DALY, E.C. (1978). Biochemical aspects of transmission at inhibitory synapses: the role of glycine. En: «Advances in neurochemistry». 3<sup>rd</sup>Ed. (B.W. Agranoff y M.H. Aprison, eds). Plenum Publishing Corporation, New York. pp: 203-294.
- ARAKI, T.; YAMANO, M.; MURAKAMI, T.; WANAKA, A.; BETZ, H. y TOHYAMA, M. (1988). Localization of glycine receptors in the rat central nervous system: an immunocytochemical analysis using monoclonal antibody. *Neuroscience* 25: 613-624.
- ARENAS-DÍAZ, G. y MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, R. (1990). Immunolocalization of cytosolic aspartate aminotransferase (cAATase) in axon terminals that form synapses in the rat cerebellar cortex. A study at electron microscopic level. *Brain Res.* 516: 77-83.
- ARMSTRONG, B.K. (1987). Size-dependent blood-brain barrier opening demonstrated with  $^{14}\text{C}$ -sucrose and 200.000 Da  $^3\text{H}$ -dextran. *Exp. Neurol.* 97: 686-696.
- ARTHUR, F.E.; SHIVERS, R.R. y BOWMAN, P.D. (1987). Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary



- endothelium: an efficient in vitro model. Dev. Brain Res. 36: 155-159.
- ATHANIKAR, J.; PERLMUTTER, L.S.; SAPERIA, D. y CHUI, H.C. (1988). Alteration of basement membrane components in dementia. Soc. Neurosci. Abstr. 14: 638-642.
- AUER, L.M.; LEBER, K. y SAYAMA, I. (1985). Effect of serotonin and its antagonist ketanserin on pial vessels. J. Cereb. Blood Flow Metab. 5: 517-522.
- AUMALLEY, M. y TIMPL, R. (1986). Attachment of cells to basement membrane collagen type IV. J. Cell. Biol. 103: 1569-1575.
- BACA, G.M. y PALMER, G.C. (1978). Presence of hormonally-sensitive adenylate cyclase receptors in capillary enriched fractions from rat cerebral cortex. Blood Vessels 15 (5): 286-298.
- BANKS, W.A. y KASTIN, A.J. (1987). Saturable transport of peptides across the blood-brain barrier. Life Sci. 41: 1319-1338.
- BANKS, W.A. y KASTIN, A.J. (1991). Leucine modulates peptide transport system-1 across the blood brain barrier at a stereospecific site within the CNS. J. Pharm. Pharmacol. 43: 252-254.
- BAR, T. y WOLFF, J.R. (1973). Quantitative beziehungen Zwischen der verzweig ungsdichte und lange von capillaren in Neocortex der Ratte wahrend der postnatalen Entwicklung. Z. Anat. EntwGesch. 141: 207-228.
- BAR, T. y WOLFF, J.R. (1976). Development and adult variations of the wall of brain capillaries in the neocortex of rat and cat. En: «The cerebral vessels wall». (J. Cervós-Navarro, E. Betz, F. Matakas y R. Wullenweber, eds). Raven Press, New York, pp: 1-6.
- BARRANTES, F.J.; BRACERAS, A. y CALDIRONI, H.A. (1985). Isolation and characterization of acetylcholine receptor membrane-associated and soluble electrocyte creatine-Kinase. J. Biol. Chem. 260: 3024-3034.
- BARON, M. y GALLEGO, A. (1972). The relation of microglia with the pericytes in the rat cerebral cortex. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 128: 42-57.
- BASCH, A. y FAZEKAS, G. (1970). Increased permeability of the blood-brain barrier following experimental thermal injury of the skin. A fluorescent and electron microscopy study. Angiologica 7: 357-364.
- BASCHONG, W.; BASCHONG-PRESIABNOTTO, C. y KELLENBERG, E. (1983). Reversible fixation for the study of morphology and macromolecular composition of fragile biological

- structures. Eur. J. Cell Biol. 32: 1.
- BEAUDET, M. y DESCARRIES, L. (1978). The monoamine innervation of rat cortex: synaptic and non-synaptic axon terminals. Neuroscience 3: 851-860.
- BEAVER, M.A. (1976). Histamine. N. Eng. J. Medicine. 294: 320-325.
- BECK, D.W.; VINTERS, H.V.; HART, M.N. y CANCELLA, P.A. (1984). Glial cells influence polarity of the blood-brain barrier. J. Neuropathol. Exper. Neurol. 43: 219-224.
- BELOVA, T.I. y JONSSON, G. (1982). Blood-brain barrier permeability and immobilization stress. Acta Physiol. Scand. 116: 21-29.
- BENDER, A. y HERTZ, L. (1986). Similarities of adenosine system in astrocytes and neurons in primary cultures. Neurochem. Res. 11: 1507-1524.
- BENSLEY, R.R. y VIMTRUP, B. (1928). On the nature of Rouget cell of capillaries. Anat. Rec. 39: 37-55.
- BERL, S.; NICKLAS, W.L. y CLARKE, D.D. (1970). Compartmentation of citric acid cycle metabolism in brain: labelling of glutamate, glutamine, aspartate and GABA by several radioactive metabolites. J. Neurochem. 17: 1008-1015.
- BERTOSSI, M.; RIBATTI, D.; MANCINI, L.; VIRGINTINO, D.; NICO, B.; QUODAMATTEO, F.; MARZULLO, A. y RONCALI, L. (1991a). Changes in the subendothelial compartment during the maturation process of cerebral microvessels. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 67 (2): 159-166.
- BERTOSSI, M.; MANCINI, L.; FAVIA, A.; NICO, B.; RIBATTI, D.; VIRGINTINO, D. y RONCALI, L. (1991b). Endothelial vesicles as a transport system in the blood-brain barrier. Morphometric study during development. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 67 (2): 167-173.
- BETZ, A.L. y GOLDSTEIN, G.W. (1978). Polarity of the blood-brain barrier: neutral amino acid transport into isolated brain capillaries. Science 202: 225-227.
- BETZ, A.L.; FIRTH, J.A. y GOLDSTEIN, G.W. (1980). Polarity of the blood-brain barrier: distribution of the enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. Brain Res. 192 (1): 17-28.
- BETZ, A.L. (1983a). Sodium transport from blood to brain: inhibition by furosemide and amiloride. J. Neurochem. 41: 1158-1164.
- BETZ, A.L. (1983b). Sodium transport in capillaries isolated from rat brain. J. Neurochem. 41 (4): 1150-1157.

- BETZ, A.L. y GOLDSTEIN, G.W. (1984). Brain capillaries: structure and function. En: «Handbook of Neurochemistry». Second edition. (A. Lajtha, ed). Chapter 16, pp: 465-480.
- BETZ, H. (1991). Glycine receptors- heterogeneous and widespread distribution in the mammalian brain. Trends Neurosci. 14 (10): 458-461.
- BINNINGTON, K.C. y LANE, N.J. (1980). Perineurial and glial cells in the tick Boophilus microplus (Acarina: Ixodidae): freeze-fracture and tracer studies. J. Neurocytol. 9: 343-362.
- BJORKLUND, A. y LINDWALL, O. (1975). Dopamine in dendrites of substantia nigra neurons: suggestion for a role in dendritic terminals. Brain Res. 83: 531-537.
- BLAKEMORE, W.F. (1969). The fate of escaped plasma protein after thermal necrosis of the rat brain: an electron microscope study. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 28: 139-152.
- BLOOM, F.E.; HOFFER, B.J. y SIGGINS, G.R. (1971). Studies on norepinephrine-containing afferents to Purkinje cells of rat cerebellum. I. Localization of the fibers and their synapses. Brain Res. 25: 501-521.
- BOCKAERT, J. y EBERSOLT, C. (1988).  $\alpha$ -Adrenergic receptors on glial cells. En: «Glial cell Receptors». (H.K. Kimelberg, ed). Raven Press, Ltd. New York. pp: 35-51.
- BODEGA, G.; SUÁREZ, I. y FERNÁNDEZ, B. (1989). The possible secretory function of astrocytes in the marginal nuclei of the avian spinal cord. J. Anat. 165: 19-27.
- BOERTJE, S.B.; WARD, S. y ROBINSON, A. (1992).  $H_2$ -receptors mediate histamine-induced variations in the permeability of the blood-brain barrier of rats. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 76 (2): 143-154.
- BOEYNAEMS, J. M. y PEARSON, J.D. (1990).  $P_2$ -Purinoreceptors on vascular endothelial cells: physiological significance and transduction mechanisms. Trends Pharmacol. Sci. 11: 34-37.
- BONVENTO, G.; MACKENZIE, E.T. y EDVINSSON, L. (1991). Serotonergic innervation of the cerebral vasculature: relevance to migraine and ischemia. Brain Res. Rev. 16 (3): 257-263.
- BONDY, S.C. y PURDY, J.L. (1974). Selective regulation of the blood-brain barrier by sensory input. Brain Res. 76: 542-545.
- BORG, J.; BALCAR, W.T.; MANDEL, P. (1976). High affinity uptake of taurine in neuronal and glial cells. Brain Res. 118: 514-516.

- BOUCHAUD, C.; Le BERT, M. y DUPONEY, P. (1989). Are close contacts between astrocytes and endothelial cells a prerequisite condition of a blood-brain barrier? The rat subfornical organ as an example. *Bio. Cell.* 67 (2): 159-166.
- BOWMAN, C.L. y KIMELBERG, H.K. (1988). Adrenergic-receptor-mediated depolarization of astrocytes. En: «Glial cell Receptors». (H.K. Kimelberg, ed). Raven Press, Ltd. New York. pp: 53-76.
- BOYA, J. (1976). An ultrastructural study of the relationship between pericytes and cerebral macrophages. *Acta Anat.* 95: 598-608.
- BRADBURY, M.W.B. y STULKOVÁ, S. (1970). Efflux mechanism contributing to the stability of the potassium concentration in the cerebrospinal fluid. *J. Physiol.* 208: 415-430.
- BRADBURY, M.W.B. (1979). The concept of a blood-brain barrier. John Wiley, Chichester. pp: 465.
- BRADBURY, M.W.B. (1986) Introductory remarks: the developing experimental approach to the idea of a BBB. En: «The neuronal microenvironment». (H.F. Cserr, ed). Ann. NY. Acad. Sci. 481: 137-141.
- BRAUN, U.; BRAUN, G. y SARGENT, T. (1980). Changes in blood-brain permeability resulting from d-amphetamine-6-hydroxydopamine and pimoide measured by a new technique. *Experientia* 36: 207-209.
- BRAUNSTEIN, A.E. (1973). Enzymes. 3<sup>rd</sup> Edition. Vol. 9. pp: 379-481.
- BRIGHTMAN, M.W. y REESE, T.S. (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell. Biol.* 40: 648-677.
- BRIGHTMAN, M.W.; REESE, T.S. y FEDER, N. (1970). Assesment with electron microscope of the permeability to peroxidase of cerebral endothelium and epithelium in mice and sharks. En: «Capillary permeability». (Alfred Benzon symposium III). Copenhagen. Musksgaard. pp: 468-486.
- BRIGHTMAN, M.W.; REESE, T.S.; OLSSON, Y. y KLATZO, I. (1971). Morphologic aspects of the blood-brain barrier to peroxidase in elasmobranchs. *Prog. Neuropathol.* 1: 146-161.
- BRIGHTMAN, M.W. (1977). Morphology of blood-brain interfaces. *Exp. Eye Res.* [Suppl] 25: 1-25.
- BROADWELL, R.D.; BALIN, B.J.; SALCMAN, M. y KAPLAN, R.S. (1983). Brain-blood barrier? Yes and no. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 7352-7356.

- BROOKS, V.B. y TACH, W.T. (1981). Cerebellar control of posture and movement. En: «Handbook of Physiology». (V.B. Brooks, ed). Sec. 1, Vol. II, Bethesda, American Physiological Society. pp: 877.
- BRUST, P. (1986). Changes in regional blood-brain transfer of L-leucine elicited by arginine vasopressin. J. Neurochem. 46: 534-541.
- BRUST, P. (1991). Blood-brain barrier transport under different physiological circumstances including ischemia. Exp. Pathol. 42 (4): 213-219.
- BUDI SANTOS, A.W. y BAR, T.H. (1986). Postnatal development of  $\gamma$ -GT activity in rat brain microvessels correspond to capillary growth and differentiation. Int. J. Devl. Neurosci. 4: 503-511.
- BUNDGAARD, M. y CSERR, N.A. (1981). Glial blood-brain barrier in elasmobranchs. Brain res. 226: 61-73.
- BURCH, H.E.; BESSEY, O.A.; LOVE, R.H. y LOWRY, O.H. (1952). The determination of Thiamine and Thiamine phosphates in small quantities of blood and blood cells. J. Biol. Chem. 198: 477-482.
- BUREAU, M.H. y OLSEN, R.W. (1991). Taurine acts on a subclass of GABA<sub>A</sub> receptors in mammalian brain in vitro. Eur. J. Pharmacol. Molecular Pharmacology Section 270: (1): 9-16.
- BURGEON, M. (1991). Serotonin, impulsivity and suicide. Human Psychopharmacol. 6: 31-36.
- BURNS, E.M.; KRUCKEBERG, T.W.; COMERFORD, L.E. y BUSCHMANN, M.B.T. (1979). Thinning of capillary walls and declining numbers of endothelial mitochondria in the cerebral cortex of aging primate, Macaca nemestrina. J. Geront. 34: 642-650.
- BURNS, E.M.; KRUCKEBERG, T.W. y GAETANO, P.K. (1981). Changes with age in cerebral capillary morphology. Neurobiol. Aging. 2: 285-291.
- BURNS, E.M.; KRUCKEBERG, T.W.; GAETANO, P.K. y SHULMAN, L.M. (1983). Morphological changes in cerebral capillaries with age. En: «Brain Aging: Neuropathology and Neuropharmacology». (J. Cervós-Navarro; H.J. Sarkander, eds). Raven Press, New York. pp: 115-132.
- BURNS, E.M. y KRUCKEBERG, T.W. (1989). The ultrastructural basis of capillary permeability. En: «Regulatory mechanism of neuron to vessel communication in the brain». (F. Battaini, S. Govoni, M.S. Magnoni y M. Trabucchi). NATO Asi Series. Series H: Cell Biology. Springer Verlag. Berlin. pp:1-20.
- BURNSTOCK, G.; MURRAY-HARPER, A.; PURVERS, M. y SIESJÖ, B.;

- WURTMAN, R.J. (1977). Round table discussion. En: «Neurogenic control of the brain circulation». (C. Owman y L. Edvinsson, eds). Pergamon press. pp: 499-510.
- BUTCHER, E.C. (1991). Cellular and molecular mechanisms that direct leukocyte traffic. Am. J. Pathol. 136: 3-11.
- CANCILLA, P.A.; BAKER, R.N.; POLLOCK, P.S. y FROMMES, S.P. (1972). The reaction of pericytes of the central nervous system to exogenous protein. Lab. Invest. 26: 376-383.
- CANGIANO, C. y CARDELLI-CANGIANO, P. (1989). Active and facilitated transport mechanism across the brain capillary endothelial cells in physiological and pathological conditions. En: «Regulatory mechanism of neuron to vessel communication in the brain». (F. Battaini, S. Govoni, M.S. Magnoni y M. Trabucchi). NATO Asi Series. Series H: Cell Biology. Springer Verlag. Berlin. pp: 37-65.
- CAPEL, P.J.A. (1975). The defined antigen substrate spheres (DASS) system and some of its applications. Ann. NY. Acad. Sci. 254: 108-118.
- CASTEJON, O.J. (1984). Submicroscopic changes of cortical capillary pericytes in human perifocal brain edema. J. Submicrosc. Cytol. 16: 601-618.
- CAVALLINI, D.; SCANDURRA, R.; DUPRÉ, S.; SANTORO, L. y BARRA, D. (1976). A new pathway of taurine biosynthesis. Physiol. Chem. Physics. 8: 157-160.
- COCKS, T.M. y ANGUS, J.A. (1983). Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. Nature 305: 625.
- COHEN, M.P.; FRANK, R.N. y KHALIFA, A.A. (1980). Collagen production by cultured retinal capillary pericytes. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 19: 90-94.
- COLLINS, G.S.C. y TOPIWALA, S.H. (1974). The release of <sup>14</sup>C-taurine from slices of rat cerebral cortex and spinal cord evoked by electrical stimulation and high potassium ion concentration. Br. J. Pharmacol. 50: 451P-452P.
- CONSTANTINIDIS, J. (1991) The hypothesis of Zinc deficiency in the pathogenesis of neurofibrillary tangles. Med. Hypotheses. 35 (4): 319-323.
- CONNEL, C.J. y MERCER, K.L. (1974). Freeze-fracture appearance of the capillary endothelium in the cerebral cortex of mouse brain. Am. J. Anat. 140: 595-599.
- COONS, A.H. (1939). Obtenido de The beginnings of immunofluorescence. J. Immunol. 82: 499-503 (1961).
- COOPER, J.R. y PINCUS, J.H. (1976). The role of thiamine in

- nervous tissue. *Neurochem. Res.* 4: 223-239.
- COURTOY, P.J. y BOYLES, J. (1983). Fibronectin in the microvasculature: localization in the pericyte-endothelial interstitium. *J. Ultrastruct. Res.* 83: 258-273.
- CRONE, C. (1971). The blood-brain barrier: facts and questions. En: «Ion homeostasis of the Brain». (B.K. Siesjö y S.C. Sørensen, eds). Munksgaard, Copenhagen, pp: 52.
- CRONE, C. y CHRISTENSEN, O. (1981a). The electrical resistance of a capillary endothelium. *J. Gen. Physiol.* 77: 49-55.
- CRONE, C. OLESEN, S.P. (1981b). Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res.* 241: 49-55.
- CRONE, C. y OLSEN, S.P. (1982). Electrical resistance of brain capillary endothelium. *Brain Res.* 241: 49-55.
- CRONE, C. (1984a). Lack of selectivity to small ions in paracellular pathways in cerebral and muscle capillaries in the frog. *J. Physiol.* 353: 317-333.
- CRONE, C. (1984b). The function of capillaries. En: «Recent advances in physiology». (P.F. Baeker, ed). Vol. 10, Churchill Livingstone, London, pp: 125-162.
- CRONE, C. (1986). The blood-brain barrier: a modified tight epithelium. En: «The blood-brain barrier in health and disease». (A.J. Suckling, M.G. Rumsby, M.W.B. Bradbury, eds). pp: 17-40.
- CSERR, H. y BUNDGAARD, M. (1984). Blood-brain interfaces in vertebrates: a comparative approach. *Amer. J. Physiol.* 246: 277-288.
- CSILLIK, B.; KNYIHAR, E.; LASZLO, I. y BONC, I. (1974). Electron histochemical evidence for the role of thiamine pyrophosphate in synaptic transmission. *Brain Res.* 70: 170-183.
- CUATRECASAS, P. y ANFINSEN, Ch. B. (1971). Affinity chromatography. *Methods in enzymology.* XXII: 345-378.
- CUELLO, A.C. (1984). Immunohistochemistry. IBRO Handbook series: methods in the neurosciences. Volume 3. John Wiley & Sons. A.C. Cuella ed.
- CUEVAS, P.; GUTIERREZ, -DIAZ, J.A.; REIMERS, D.; DUJOVNY, M.; DIAZ, F.G. y AUSMAN, J.I. (1984). Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries. *Anat. Embryol.* (Berl). 170: 155-159.
- CUNNINGHAM, V.J. (1986). The influence of transport and metabolism on brain glucose content. En: «The neuronal microenvironment». (H.F. Cserr, ed). Ann. NY. Acad. Sci.

- CUNNINGHAM, V.J.; CREMER, J.E. y HARGREAVES, R.J. (1988). Relationship between neuronal activity energy metabolism and cerebral circulation. En: «Regulatory mechanisms of neuron to vessels communication in the brain». (F. Battaini, S. Govoni, M.S. Magnoni y M. Trabucchi). NATO Asi Series. Series H: Cell Biology. Springer Verlag. Berlin. Vol. 33. pp: 325-344.
- CURRAN, E.J. y BECKER, J.B. (1991). Changes in blood-brain barrier permeability are associated with behavioural and neurochemical indices of recovery following intraventricular adrenal medulla grafts in an animal model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 114 (2): 184-192.
- CURTIS, D.R.; PHILLIS, J.W. y WATKINS, J.C. (1960). The chemical excitation of spinal neurons by certain aminoacids. *J. Physiol. (Lond).* 150: 656-682.
- CURTIS, D.R. y JOHNTON, G.A.R. (1974). Aminoacid transmitters in mammalian central nervous system. *Rev. Physiol. Pharmacol.* 69: 97-188.
- CUTLER, R.W.P., LORENZO, A.V. y BARLOW, C.F. (1968). Changes in blood-brain barrier permeability during pharmacologically induced convulsions. *Prog. Brain Res.* 29: 367-384.
- CAHN, L.S.; LI, W.; KHATAMI, M. y ROCKEY, J.H. (1986). Actin in cultured bovine retinal capillary pericytes: morphological and functional correlation. *Exp. Eye. Res.* 43: 41-54.
- CHANG, J.Y. y OWMAN, Ch. (1986). Immunohistochemical and pharmacological studies on serotonergic nerves and receptors in brain vessels. *Acta Physiol. Scand.* 127 (552): 49.
- CHAN-PALAY, V.; PALAY, S.L. y WU, J.Y. (1982a). Saggittal cerebellar microbands of taurine neurons: immunocytochemical demonstration by using antibodies against the taurine-synthesizing enzyme cysteine sulfinic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4221-4225.
- CHAN-PALAY, V.; LIN, C.T.; PALAY, S.; YAMAMOTO, M. y WU, J.Y. (1982b). Taurine in the mammalian cerebellum: demonstration by autoradiography with <sup>3</sup>H-Taurine and immunocytochemistry with antibodies against Taurine synthesizing enzyme, cysteine sulfinic-acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 2695-2699.
- CHRISTENSEN, H.N. (1973). On the development of amino acid transport system. *Fedn. Proc.* 32: 19-28.
- CHRISTENSEN, T.G.; DIEMER, N.H.; LAURSEN, H. y GJEDDE, A. (1981). Starvation accelerates blood-brain glucose transfer. *Acta*



Physiol. Scand. 112: 221-223.

- DABIRE, H. y RICHER, C. (1991). Implication of the central nervous system in the systemic and regional hemodynamics of two centrally acting hypotensive drugs, flesinoxan and clonidine, in the rat. J. Cardiovasc. Pharmacol. 18 (4): 605-613.
- DALLAIRE, L.; TREMBLAY, L. y BELIVEAU, R. (1991) Purification and characterization of metabolically active capillaries of the blood-brain barrier. Biochem. J. 276 (15): 745-752.
- D'AMORE, P.A. y SHEPRO, D. (1977). Stimulation of growth and calcium influx in cultured bovine aortic endothelial cells by platelets and vasoactive substances. J. Cell Physiol. 92: 117-184.
- DANIEL, P.M.; LOVE, E.R. y PRATT, O.E. (1978). The effect of age upon the influx of glucose into the brain. J. Physiol. (Lond). 274: 141-148.
- DANIELS, M.; VIGNY, M.; SONDEREGGER, P.; BAUER, H.C. y VOGEL, Z. (1984). Association of laminin and other basement membrane components with regions of high acetylcholine receptor density on cultured myotubes. Int. J. Dev. Neurosci. 2: 87-99.
- DARNELL, J.; LODISH, H. y BALTIMORE, D. (1988). Transporte a través de las membranas celulares. En: «Biología Celular y Molecular». Editorial Labor, S.A. Capítulo 15. pp: 615-664.
- DEBAULT, L.E. y CANCELLA, P.A. (1980).  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro. Science 207: 635-655.
- DEFEUDIS, F.V. (1986). New studies on the cerebrovascular endothelium-possible relevance to the interpretation of "precursor-loading" experiments. Trends Pharmacol. Sci. 7: 51-52.
- DELONCLE, R.; GUILLARD, O.; TURQ, P. y PRULIERE, N. (1990) Alzheimer's disease and dementia syndromes consecutive to imbalanced mineral metabolism subsequent to blood-brain barrier alteration. En: «Metal Ion in Biology and Medicine». (P. Collery, L.A. Poirier, M. Manfait, J.C. Etienne, eds). John Libbey Eurotext, Paris., pp: 336-338.
- del RIO-HORTEGA, P. (1917). Noticia de un nuevo y fácil método para la coloración de la neuroglía y del tejido conectivo. Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid 15: 367-368.
- del RIO-HORTEGA, P. (1919). El tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglía en estado normal. II Intervención de la microglía en los procesos patológicos. III. Naturaleza probable de la microglía. Bol. Soc. Esp. Biol. 9: 69-120.

- del RIO-HORTEGA, P. (1920). La microglía y su transformación en células en bastoncito y en cuerpos granuloalipos. Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid 18: 37-82.
- DeROBERTIS, E.D.P. y DeROBERTIS, E.M.F. (1983). Los ribosomas y el sistema digestivo de la célula. Peroxisomas. En: «Biología Celular y Molecular». Editorial El Ateneo, S.A. Décima edición. Capítulo 12. pp: 267-283.
- DERMIETZEL, R. (1975). Junctions in the central nervous system of the cat. IV. Interendothelial junctions of cerebral blood vessels from selected areas of the brain. Cell. Tissue Res. 164: 45-62.
- DERMIETZEL, R. y KRAUSE, D. (1991). Molecular anatomy of the blood-brain barrier as defined by immunocytochemistry. Int. Rev. cytol. 127: 57-109.
- DIAZ-FLORES, L.; GUTIERREZ, R.; VARELA, H.; RANCEL, N. y VALLADARES, F. (1991). Microvascular pericytes- A review of their morphological and functional characteristics. Histol. Histopathol. 6 (2): 269-286.
- DOCZI, T.; SZERDAHELYI, P.; GULYA, K. y KISS, J. (1982). Brain water accumulation after the central administration of vasopressin. Neurosurg. 11: 402-407.
- DOCZI, T. (1987). Regulation of water and electrolyte contents: the possible involvement of central natriuretic factor. Neurosurg. 21: 454-458.
- DODSON, R.E. (1973). Electron microscopy of microvessels pericytes in the brain. Cytobiol 1: 183-188.
- DONAHUE, S. y PAPPAS, G.D. (1961). The fine structure of capillaries in the cerebral cortex of the rat at various stages of development. Am J. Anat. 108: 331-347.
- DONAHUE, S. (1964). A relationship between fine structure and function of blood vessels in the cerebral nervous system of rabbit fetuses. Am. J. Anat. 115: 17-26.
- DOW, K.E.; MIRSKI, S.E.L.; RODER, J.C. y RIOPELLE, R.J. (1988). Neuronal proteoglycans: biosynthesis and functional interaction with neurons in vitro. J. Neurosci. 8: 3278-3289.
- DREYFUS, P.M. y VICTOR, M. (1961). Effects of thiamine deficiency on the central nervous system. Am. J. Clin. Nutr. 9: 414-425.
- DREYFUS, P.M. (1976). Thiamine deficiency encephalopathy: thoughts on its pathogenesis. En: «Thiamina». (C.J. Gluber, M. Fujiwara, P.M. Drayfus, eds). John Wiley and Sons. New York. pp: 229-239.

- DROPP, J.J. (1972). Mast cells in the central nervous system of several rodents. *Anat. Rec.* 174: 227-238.
- DROPULIC, B. y MASTERS, G.L. (1990). Entry of neurotropic arboviruses into the central nervous system: an in vitro study using mouse brain endothelium. *J. Infect. Dis.* 161: 685-691.
- DUCKLES, S.P. (1982). Choline acetyltransferase in cerebral arteries: modulator of amino acid uptake? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 223: 716-720.
- DURIEUTRUTMANN, O.; FOIGNANTCHAVERTO, N.; PERDOMO, J.; GOUNON, P.; STROSBURG, A.D. y COURAD, P.D. (1991). Immortalization of brain capillary endothelial cell with maintenance of structural characteristics of the blood-brain barrier. In *Vitro Cellular and Developmental Biology* 27 (10): 771-778.
- DUX, E. y JOÓ, F. (1982). Effects of histamine on brain capillaries. *Exp. Brain Res.* 47 (2): 252-258.
- DUX, E. (1987). Protective effect of antihistamines on cerebral oedema induced by experimental pneumothorax in newborn piglets. *Neuroscience* 22: 317-321.
- ECCLES, J.C.; LLINÁS, R. y SASAKI, K. (1966). The excitatory synaptic action of climbing fibers on the Purkinje cells of the cerebellum. *J. Physiol.* 183: 268-296.
- ECCLES, J.; ITO, M. y SZENTAGOTHAÏ, J. (1967). The cerebellum as a neuronal machine. Berlin-Heidelberg, New York, Springer.
- ECKENSTEIN, F. y BAUGHMAN, R.W. (1984). Two types of cholinergic innervation in cortex, one co-localized with vasoactive intestinal polypeptide. *Nature* 309: 153-155.
- EDGAR, D.; TIMPL, R. y THEONEN, H. (1984). The heparin-binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neural survival. *EMBO. J.* 3: 1463-1468.
- EDVINSSON, L. y HARDEBO, J.E. (1976). Characterization of serotonin receptors in intracranial and extracranial vessels. *Acta Physiol. Scand.* 95: 523.
- EDVINSSON, L. y MACKENZIE, E.T. (1977) Amine mechanisms in the cerebral circulation. *Pharmacol. Rev.* 28: 275-348.
- EDVINSSON, L.; HARDEBO, J.E. y OWMAN, C. (1978). Pharmacological analysis of 5-HT receptors in isolated intracranial and extracranial vessels of cat and man. *Circ. Res.* 42: 143-151.
- EDVINSSON, L. y KRAUSE, D.N. (1979). Pharmacological characterization of GABA receptors mediating vasodilation of cerebral arteries in vitro. *Brain Res.* 173: 89-87.

- EDVINSSON, L.; LARSSON, B.; SHÄRBY, T. (1980). Effect of the GABA receptor antagonist muscimol on regional cerebral flow in the rat. *Brain Res.* 185: 445-448.
- EDVINSSON, L.; MCCULLOCH, J. y UDDMAN, R. (1982). Feline cerebral veins and arteries: comparison of autonomic innervation and vasomotor responses. *J. Physiol.* 325: 161-173.
- EDVINSSON, L.; DEGNERURCE, A.; DUVERGER, D.; MACKENZIE, E.T. y SCATTON, B. (1983). Central serotonergic nerves project to the pial vessels of the brain. *Nature* 306: 55-57.
- EDVINSSON, L. y FREDHOLM, B.B. (1983). Characterization of adenosine receptors in isolated cerebral arteries of cat. *Br. J. Pharmacol.* 80: 631-637.
- EDVINSSON, L.; BIRATH, E.; UDDMAN, R.; LEE, J.F.; DUVERGER, D.; MACKENZIE, E.T. y SCATTON, B. (1984). Indoleaminergic mechanisms in brain vessels; localization, concentration, uptake and in vitro responses of 5-hydroxytryptamine. *Acta Physiol. Scand.* 121: 291.
- EDVINSSON, L. (1985a). Functional role of perivascular peptides in the control of cerebral circulation. *Trends Neurosci.* 8: 126-131.
- EDVINSSON, L.; FREDHOLM, B.B.; HAMEL, E.; JANSEN, I. y VERRECCHIA, C. (1985b). Perivascular peptides relax cerebral arteries concomitant with stimulation of cyclic adenosine monophosphate accumulation or release of an endothelium-derived relaxing factor in the cat. *Neurosci. Lett.* 58: 213-217.
- EHRLICH, P. (1885). *Der sauerstoff bedürfnis des organismus. Eine farbenanalytische studie.* Hirschwald, Berlin. pp: 69-72.
- ENGWALL, E. y PERLMANN, P. (1971). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). III. Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 871-880.
- ERMISCH, A.; LANDGRAF, R. y RUHLE, H.-J. (1982). Neuroactive peptides and the blood-brain barrier. *Neuroscience* 7: 664.
- ESQUERDA COLELL, J.E. (1990). Estrategias generales en los métodos de inmunomarcage ultraestructural. En: «Técnicas de inmunocitoquímica en microscopía electrónica». (M. Dufort, J. Renau, J. Serratosa y S. Vilaró). Capítulo 1, pp: 1-12.
- ESSMAN, W. (1978). Serotonin in health and disease. Spectrum Publications, New York.
- ESTRADA, C.; HAMEL, E. y KRAUSE, D.N. (1983). Biochemical evidence for cholinergic innervation of intracerebral blood vessels. *Brain Res.* 266: 261-270.

- FALCK, B.; HILLARP, N. Å.; THIEME, G. y TORP, A. (1962). Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J. Histochem. Cytoche.* 10: 348.
- FARQUHAR, M.G. y HARTMANN, J.F. (1956). Electron microscopy of cerebral capillaries. *Anat. Rec.* 124: 288-289.
- FENSTERMACHER, J.D. y JONSON, J.A. (1966). Filtration and reflection coefficients of the blood-brain barrier. *Amer. J. Physiol.* 211: 341-346.
- FERNÁNDEZ, B.; SUÁREZ, I. y GIANOTTI, C. (1983). Fine structure of astrocytic mitochondria in the hypothalamus of the hamster. *J. Anat.* 137 (3): 483-488.
- FERNÁNDEZ, B.; SUÁREZ, I. y GONZÁLEZ, G. (1984). Topographical distribution of the astrocytic lamellae in the hypothalamus. *Anat. Anz., Jena* 156: 31-37.
- FILLIT, H.M.; KEMENY, E.; LUINE, V.; WEKSLER, M.E. y ZABRISKIE, J.B. (1987). Antivascular antibodies in the sera of patients with senile dementia of the Alzheimers's type. *J. Geront.* 42: 180-184.
- FIRTH, J.A. (1977). Cytochemical localization of the K<sup>+</sup> regulation interface between blood and brain. *Experientia* 33 (3): 1093-1094.
- FISHMAN, R.A. (1987). Is there a therapeutic role for osmotic breaching of the blood-brain barrier? *Ann. Neurol.* 22: 289-299.
- FONNUM, F. (1970). Topographical and subcellular localization of choline acetyltransferase in rat hippocampal region. *J. Neurochem.* 17:1029-1037.
- FOX, P.T. y RAICHLE, M.E. (1986). Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subject. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 1140-1144.
- FREDERICKSON, R.C.A.; NEUSS, M.; MORZORATI, S.L. y McBRIDE, W.J. (1978). A comparison of the inhibitory effects of taurine and GABA on identified Purkinje cells and other neurons in the cerebellar cortex of the rat. *Brain Res.* 145: 117-126.
- FREDHOLM, B.B.; JAUSEN, I. y EDVINSSON, L. (1985). Neuropeptide Y is a potent inhibitor of cyclic AMP accumulation in feline cerebral blood vessels. *Acta Physiol. Scand.* 124: 467-469.
- FRIEDMAN, A.H. y DAVIS, J.N. (1980). Identification and characterization of adrenergic receptors and catecholamine-stimulated adenylate cyclase in hog pial membranes. *Brain. Res.* 183: 89-102.

- FRIEDMANN, U. (1943). Permeability of the blood-brain barrier to neurotrophic viruses. Arch. Pathol. 35: 912-935.
- FROSTHOLM, A. y ROTTER, A. (1985). Glycine receptor distribution in mouse CNS: autoradiographic localization of H<sup>3</sup>-strychnine binding sites. Brain Re. Bull. 15: 473-486.
- FUJIWARA, M.; MURAMATSU, T. y SHIBATA, S. (1975).  $\gamma$ -Aminobutyric acid receptor on vascular smooth muscle of dog cerebral arteries. Brit. J. Pharmacol. 55: 561-562.
- FURCHGOTT, R.F. y ZAWADZKI, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature (Lond). 288: 373-376.
- FÜRTH, O. (1903). Vergleichende chemische physiologie der niederen tiere. Jene. Fischer. 437: 206-274.
- GALLYAS, F.; GÖRCS, T. y MERCHENTHALER, I. (1982). High-grade intensification of the end-product of the diaminobenzidine reaction for peroxidase histochemistry. J. Histochem. Cytochem. 30 (2): 333-354.
- GARBISA, S. y NEGRO, A. (1984). Macromolecular organization and functional architecture of basement membranes. Appl. Pathol. 2: 217-222.
- GAW, A.J.; WASWORTH, R.H. y HUMPHREY, P.P.A. (1990). Pharmacological characterisation of postjunctional 5-HT receptors in cerebral arteries from the sheep. Eur. J. Pharmacol. 179 (1-2): 35-44.
- GEFFEN, L.B. (1976). Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra. Nature 260: 258-269.
- GILBERT, G.J. (1965) Focal breakdown of the blood-brain barrier by specific sensory stimulation. Trans. Am. Neurol. Assoc. 90: 246-248.
- GOLDMANN, E. (1909). Die äussere und innere sekretion des gesunder und kranken organismus im Lichte der "vitalen Färbung". Beir. Klin. Chirurg. 64: 192-265.
- GOLDMANN, E.E. (1913). Vitalfärbung am zentralnervensystem. Berlin Eimer.
- GOLDSTEIN, G.W.; WOLONSKY, J.S.; CSEJTEY, J. y DIAMOND, I. (1975). Isolation of metabolically active capillaries from rat brain. J. Neurochem. 25: 715-717.
- GOLDSTEIN, G.W. (1979). Relation of potassium transport to oxidative metabolism in isolated brain capillaries. J. Physiol. 286: 185-195.
- GOLDSTEIN, G.W. y BETZ, A.L. (1983). Recent advances in understanding brain capillary function. Ann. Neurol. 14:

- GOLDSTEIN, G.W. y BETZ, A.L. (1986a). The blood-brain barrier. *Scientific America* 255: 74-83.
- GOLDSTEIN, G.W. y BETZ, A.L. (1986b). Blood vessels and the blood-brain barrier. En: «Diseases of the Nervous System». (A.K. Ashuny, G.M. McKhann y W.I. McDonald, eds). W.B. Saunders, Philadelphia, pp:172-184.
- GOLDSTEIN, G.W. (1988). Endothelial cell-astrocyte interactions. A cellular model of the blood-brain barrier. *Ann. NY. Acad. Sci.* 529: 31-39.
- GONZÁLEZ, J.L. y SANTOS-BENITO, F.F. (1987). Synthesis of acetylcholine by endothelial cells isolated from rat brain cortex capillaries. *Brain Res.* 412: 148-150.
- GOUD, B.; FAIVRE-BAUMAN, A.; PICART, R. y TIXIER-VIDAL, A. (1991). Subcellular distribution of clathrin in cultured hypothalamic neurons. *Biol. Cell.* 72 (1-2): 83-92.
- GRAEBER, M.B.; STREIT, W.J. y KREUTZBERG, G.W. (1989). Identity of ED-2-positive perivascular cells in rat brain. *J. Neurosci. Res.* 22: 103-106.
- GRAHAM, R.C. y KARNOWSKY, M.J. (1966). The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* 14: 292-302.
- GRAMMAS, P. (1983). Identification of muscarinic receptors in rat cerebral cortical microvessels. *J. Neurochem.* 40: 645-651.
- GREENWOOD, J.; LOVE, E.R. y PRATT, O.E. (1982). Kinetics of thiamine transport across the blood-brain barrier in the rat. *J. Physiol. (Lond)*. 327: 95.
- GRIFFITH, S.G.; LINCOLN, J. y BURNSTOCK, G. (1982). Serotonin as a neurotransmitter in cerebral arteries. *Brain Res.* 247: 388-392.
- GROME, J.J. y HARPER, A.M. (1983). The effects of serotonin on local cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 3: 71-77.
- GROSS, P.M. (1981). Histamine  $H_1$ - and  $H_2$ -receptors are differentially and spatially distributed in cerebral vessels. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1 (4): 441-446.
- GROSS, P.M.; TEASDALE, G.M.; ANGERSON, W.J. y HARPER, A.M. (1981).  $H_2$ -receptors mediate increases in permeability of the blood-brain barrier during arterial histamine infusion. *Brain Res.* 210: 396-400.

- GROSS, P.M.; WALL, K.M.; PANG, J.J.; SHAVER, S.W. y WAINMAN, D.S. (1990). Microvascular specializations promoting rapid interstitial solute dispersion in nucleus tractus solitarius, *Am. Physiol. Soc.* 8: 1131-1138.
- GROSS, P.M. (1991). Morphology and physiology of capillary systems in subregions of the subfornical organ and area postrema. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69 (7): 1010-1025.
- GRUBB, R.L. y RAICHLE, M.E. (1981). Intraventricular angiotensin II increases brain vascular permeability. *Brain Res.* 210: 426-430.
- GRUBB, R.L. (1977). Effects of subarachnoid hemorrhage on cerebral blood volume, blood flow and oxygen utilization in humans. *J. Neurosurg.* 46: 446-453.
- GUIDOTTI, A.; BADIANI, G. y PEPEN, G. (1972). Taurine distribution in cat brain. *J. Neurochem.* 19: 431-435.
- GUIDOTTI, A.; BIGGIO, G. y COSTA, E. (1975). 3-Acetylpyridine: a tool to inhibit the tremor and the increase of cGMP content in cerebellar cortex elicited by harmaline. *Brain Res.* 96: 201-205.
- HAAS, H.L. y HÖSLI, L. (1973). The depression of brain stem neurons by taurine and its interaction with strychnine and bicuculline. *Brain Res.* 57: 399-402.
- HAJDU, F.; HASSLER, R. y BAK, I.K. (1973). Electron microscopic study of the substantia nigra and the stria-nigral projection in the rat. *Z. Zellforsch.* 146: 297-321.
- HAMEL, E.; KRAUSE, D.N. y ROBERTS, E. (1983). Glutamic acid decarboxylase activity in intracerebral blood vessels. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 3: 198-199.
- HANKO, J.; HARDEBO, J.E. y OWMAN, C. (1982). Effects of various neuropeptides on cerebral blood vessels. En: «Cerebral blood flow: effects of nerve and neurotransmitters». (D. Heistad y M.L. Marcus, eds). Elsevier North Holland, Amsterdam. pp: 227-234.
- HANSEN, A.J.; LUND-ANDERSEN, H. y CRONE, C. (1977).  $K^+$  permeability of the blood-brain barrier, investigated by aid of a  $K^+$ -sensitive microelectrode. *Acta Physiol. Scand.* 101: 438-445.
- HANSSON, E.; ERICKSSON, P. y NILSSON, M. (1985). Amino acid monoamine transport in primary astroglial cultures from defined brain regions. *Neurochem. Res.* 10: 1335-1341.
- HARDEBO, J.E. y OWMAN, C.H. (1980). Characterization of the in vitro uptake of monoamines into brain microvessels. *Acta Physiol. Scand.* 108: 223-229.



- HARDEBO, J.E.; KAHRSTROM, J. y OWMAN, C. (1987). P<sub>1</sub> and P<sub>2</sub> purine receptors in brain circulation. *Eur. J. Pharmacol.* 144: 343-352.
- HARIK, S.I.; SHARMA, V.K.; WEATHERBAE, J.R.; WARREN, R.H. y BANERJEE, S.P. (1980). Adrenergic receptors of cerebral microvessels. *Eur. j. pharmacol.* 61: 207-208.
- HARIK, S.I.; SHARMA, V.K.; WEATHERBAE, J.R.; WARREN, R.H. y BANERJEE, S.P. (1981). Adrenergic and cholinergic receptors of cerebral microvessels. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1: 329-338.
- HARPER, A.M.; DESHMUKH, V.D.; FITCH, W.; GRAHAM, D.I. y MACKENZIE, E.T. (1977). Effect of cervical sympathetic stimulation and ablation of CBF in normotensive, hypotensive and hypertensive primates. En: «Neurogenic control of brain circulation». Proceedings of the International Symposium held in the Wenner-Gren Center, Stockholm. (Ch. Owman y L. Edvinsson, eds). pp: 457-368.
- HARRISON, J.B. y LANE, N.J. (1981). Lack of restriction at the blood-brain barrier interface in Limulus despite atypical junctional arrangement. *J. Neurocytol.* 10: 233-250.
- HARMAN, B.K. (1973). The innervation of cerebral blood vessels by central noradrenergic neurons. En: «Frontiers in catecholamine research». (E. Usdin y S.H. Snyder, eds). Pergamon Press, New York. pp: 91-96.
- HARTMAN, B.K.; SWANSON, L.W.; RAICHLE, M.E.; PRESKORN, S.H. y CLARRK, H.B. (1980). Central adrenergic regulation of cerebral microvascular permeability and physiological evidence. *Adv. Exp. Med. Biol.* 131: 113-126.
- HARTMAN, B.K. (1989). Central noradrenergic innervation of cerebral microvessels: implications for an autonomic nervous system within the brain. En: «Regulatory mechanisms of neuron to vessels communication in the brain». (F. Battaini, S. Govoni, M.S. Magnoni y M. Trabucchi). NATO Asi Series. Series H: Cell Biology. Springer Verlag. Berlin. Vol. 33. pp: 65-74.
- HASSEL, J.R.; ROBEY, P.G.; BARRACH, H.J.; WILCZEK, J.; RENNARD, S.I. y MARTIN, G.R. (1980). Isolation of a heparan sulfate-containing proteoglycan from basement membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 4494-4498.
- HAUSEN, R.B.; HANLEY, D.F.; WILSON, D.A. y TRAYSTMAN, R.J. (1987). Effect of intra-arterial arginine vasopressin (AVP) on neurohypophyseal and regional cerebral blood flow. *Fed. Proc.* 46: 1070.
- HEE-CHEONG, M.; FLETCHER, T.; KRYSKI, S.K. y SEVERSON, D.L. (1985). Diacylglycerol lipase and kinase activities in rat brain microvessels. *Biochim. Biophys. Acta.* 833: 59-68.

- HENN, F.A. y HAMBERGER, A. (1971). Glial cell function: uptake of transmitters substances. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68: 2686-2690.
- HERBST, T.J.; RAICHLE, M.E. y FERRENDI, J.A. (1979).  $\beta$ -adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate concentration in brain microvessels. Science 204: 330-332.
- HERMAM, I.M. y JACOBSON, S. (1988). In situ analysis of microvascular pericytes in hypertensive rat brains. Tissue Cell 20: 1-12.
- HERTZ, L. (1989). Functional interactions between neurons and glial cells, En: «Regulatory mechanisms of neuron to vessels communication in the brain». (F. Battaini, S. Govoni, M.S. Magnoni y M. Trabucchi). NATO Asi Series. Series H: Cell Biology. Springer Verlag. Berlin. Vol. 33. pp: 271-306.
- HERZOG, G. (1914). Uber adventitielle zellen und uber die Entstrhunh von granulierten Element. Verkan dl. Deut. Ges. Pathol. 17: 562-564.
- HODGSON, A.; PENKE, B.; ERDEI, A.; CHUBB, I.W. y SOMOGYI, P. (1985). Antiserum to gamma-aminobutyric acid. I. Preparation and characterization using a new model system. J. Histochem. Cytochem. 33: 229-239.
- HOGAN, D.L. y SMITH, G.H. (1982). Unconventional application of standard light and electron immunocytochemical analysis to aldehyde-fixed, araldite-embedded tissue. J. Histochem. Cytochem. 30 (12): 1301-1306.
- HÖKFELT, T. y FUXE, K. (1969). Cerebellar monoamine nerve terminals, a new type of afferent fibers to the cortex cerebelli. Exp. Brain Res. 9: 63-72.
- HÖKFELT, T. y LJUNGDAHL, A. (1970). Cellular localization of labeled gamma-aminobutyric acid ( $^3\text{H}$ -GABA) in rat cerebellar cortex: an autoradiographic study. Brain Res. 22: 391-396.
- HÖKFELT, T. y LJUNGDAHL, A. (1972). Autoradiographic identification of cerebral cerebellar cortical neurons accumulating labeled gamma-aminobutyric acid, ( $^3\text{H}$ -GABA). Exp. Brain Res. 14: 354-362.
- HOLOPANIEN, I.; KONTRO, P. y OJA, S.S. (1985). Release of prelabeled taurine and hypotaurine from astrocytes in primary culture: stimulation by calcium-free media. Neurochem Res. 10: 123-130.
- HORIKOSHI, T.; ASANUMA, A.; YANAGISAWA, K. ANZAI, K. y GOTO, S. (1988). Taurine and  $\delta$ -alanine act on both GABA abd Glicine receptors in xenopus oocyte injected with mouse brain messenger RNA. Mol. Brain. Res. 4: 97-105.

- HÖSLI, L. y HÖSLI, E. (1988). Electrophysiologic and autoradiographic evidence for receptors for biogenic amines on astrocytes in explant cultures of rat CNS. En: «Glial Cell Receptors», (H.K. Kimelberg, ed). Raven Press, Ltd. New York. pp: 77-93
- HOYUMPA, A.M. (1986) The unfolding GABA story. *Hepatology* 6: 1042-1044.
- HUANG, M. y DRUMMOND, G.I. (1979). Adenylate cyclase in cerebral microvessels: action of guanine nucleotides, adenosine, and other agonists. *Molec. Pharmacol.* 16: 462-472.
- HUANG, M.; HANLEY, D.A. y RORSTAD, O.P. (1983). Parathyroid hormone stimulates adenylate cyclase in rat cerebral microvessels. *Life Sci.* 32: 1009-1014.
- HUANG, M. y RORSTAD, O.P. (1983). Effects of vasoactive intestinal polypeptide, monoamines, prostaglandins and 2-chloroadenosine on adenylate cyclase in rat cerebral microvessels. *J. Neurochem.* 40: 719-726.
- HUANG, M. y RORSTAD, O.P. (1984). Cerebral vascular adenylate cyclase: evidence for coupling to receptors for vasoactive intestinal polypeptide and parathyroid hormone. *J. Neurochem.* 43: 849-856.
- HUGHES, J.D., WYERS, F.K.; SMITH, K. y TORACK, R.M. (1973). Nosological problems in dementia. A clinical and pathological study of 11 cases. *Neurology* 23: 344-351.
- HUTCHINSON, H.T.; EISENBERG, H.M. y HABER, B. (1985). High-affinity of glutamate in rat brain microvessels. *Exp. Neurol.* 85: 260-269.
- HUXTABLE, R.J. (1981). Insights on function: metabolism and pharmacology of taurine in the brain. En: «The role of peptides and amino acids as neurotransmitters» (J.B. Lombardini y A. Kenny, eds). A.R. Liss Inc, New York. pp: 53-97.
- HUXTABLE, R.J. y SEBRING, L.A. (1986). Towards a unifying theory for the actions of taurine. *Trends Pharmacol. Sci.* 7: 481-485.
- HUXTABLE, R.J. (1989). Taurine in the CNS and the mammalian actions of taurine. *Prog. Neurobiol.* 32: 471-533.
- HUXTABLE, R.J. (1990a). Taurine interactions with ionic conductances in excitable membranes. En: «Taurine: functional neurochemistry, physiology and cardiology». Wiley Liss Inc., 351: 157-161.
- HUXTABLE, R.J. (1990b). The interaction between taurine, calcium and phospholipids: further investigations of a trinitarian hypothesis. En: «Taurine: functional neurochemistry,

physiology and cardiology». Wiley Liss Inc., 351: 185-196.

IADECOLA, C.; ARNERIC, S.P.; TUCKER, L.W.; BAKER, H. y REIS, D.J. (1985). Cerebral cortical neurons are required for the cortical vasodilation elicited by stimulation of the fastigial nucleus in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 5: 519-520.

IBARAGI, M. (1988). Rat atrial natriuretic polypeptide binding sites in rat brain microvessels. *Neurochem. Res.* 13: 275-276.

IMAI, H.; OKUNO, T.; WU, J.Y. y LEE, T.J.F. (1991). GABAergic innervation in cerebral blood vessels: an immunohistochemical demonstration of L-glutamic acid decarboxylase and GABA transaminase. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11: 129-134.

INAGAKI, N.; KAMISAKI, Y.; KIYAMA, H.; HORIO, Y.; TOHYAMA, M. y WADA, H. (1984). Immunocytochemical localization of cytosolic and mitochondrial glutamic oxalacetic transaminase isoenzymes in rat retina as markers for the glutamate aspartate neuronal system. *Brain Res.* 325: 336-339.

INOMATA, K.; YOSHIOKA, T.; NASU, F. y MAYAHARA, H. (1984). Ultracytochemical studies of capillary endothelial cells in the rat central nervous system. *Acta Anat.* 118: 242-248.

ITAKURA, T.; YAMAMOTO, K.; TOHYAMA, M. y SHIMIZU, N. (1977). Central dual innervation of arterioles and capillaries in the brain. *Stroke* 8: 360-365.

IZUMI, T.; SHIBATA, Y. y YAMAMOTO, T. (1991). Quick-freeze, deep-etch studies of endothelial components, with special reference to cytoskeletons and vesicle structures. *J. Electro. Microsc. Tech.* 19 (3): 316-326.

JACOBSEN, J.G.; THOMAS, L.L.; SMITH, L.H. (1964). Properties and distribution of mammalian L-cysteine sulphinic acid carboxylase. *Biochim Biophys. Acta.* 85: 103-116.

JACOBSEN, J.G. y SMITH, L.H. (1968). Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol. Rev.* 48: 424-511.

JAEGGER, C.B. (1985). Cytoarchitectonics of substantia nigra grafts: a light and electron microscopic study of immunocytochemically identified dopaminergic neurons and fibrous astrocytes. *J. Comp. Neurol.* 231: 121-135.

JAEGGER, C.B.; WINN, S.R.; TRESCO, P.A. y AEBISCHER, R. (1991). Repair of blood-brain barrier following implantation of polymer capsules. *Brain Res.* 551 (1-2): 163-170.

JANCER, R.C. y RAFF, M.C. (1987). Astrocytes induce blood-brain

- barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325: 253-257.
- JINGU, Y.; AOKI, Y. y ITHO, H. (1986). Serum creatine kinase release and alpha- and beta-adrenergic receptors. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 282: 262-275.
- JOJART, I.; JOÓ, F.; SIKLOS, L. y LASZLO, F.A. (1984). Immunoelectronhistochemical evidence for innervation of brain microvessels by vasopressin-immunoreactive neurons in the rat. *Neurosci. Lett.* 51: 259-264.
- JOÓ, F. (1971). Increased production of coated vesicles in the brain capillaries during enhanced permeability of the blood-brain barrier. *Br. J. Exp. Pathol.* 52: 646-649.
- JOÓ, F. (1972). Effect of N<sup>6</sup>,O<sup>6</sup>-dibutyryl cyclic 3',5'-adenosine monophosphate on the pinocytosis of brain capillaries in mice. *Experientia*, 28: 1470-1471.
- JOÓ, F.; RAKANZAY, Z. y WOLLEMAN, M. (1975). cAMP-mediated regulation of the permeability in the brain capillaries. *Experientia* 31 (5): 582-583.
- JOÓ, F. y TOTH, I. (1975). Brain adenylate cyclase: its common occurrence in the capillaries and astrocytes. *De Naturwissenschaften* 8: 397.
- JOÓ, F.; SZUCS, A. y CSANDA, E. (1976). Metiamide-treatment of brain edema in animal exposed to 90 yttrium irradiation. *J. Pharm. Pharmacol.* 28: 162-163.
- JOÓ, F. (1979b). Significance of adenylate cyclase in the regulation of the permeability of brain capillaries. En: «Pathophysiology of cerebral energy metabolism». (B.B. Mrsulja, L.M. Takie, I. Klatzo y M. Spatz, eds). Plenum Press, New York, pp: 211-220.
- JOÓ, F.; DUX, E.; KARNUSHINA, I.L.; HALASZ, N.; GECSE, A.; OTTECZ, A. y MEZEI, Z. (1981). Histamine in brain capillaries. *Agents actions* 11 (1-2): 129-134.
- JOÓ, F.; TEMESVARI, P. y DUX, E. (1983). Regulation of the macromolecular transport in the brain microvessels: the role of cGMP. *Brain Res.* 278: 165-174.
- JOÓ, F. (1986). New aspects to the function of the cerebral endothelium. *Nature* 321: 197-198.
- JOÓ, F.; OLAH, Z.; NOVAK, R.; LENGYEL, I. y DUX, E. (1988). Second messenger effects on protein phosphorylation in brain microvessels. *Ann. Soc. Neurochem.* 19: 99-108.
- JOÓ, F. (1989). Physiological and pathological events mediated by capillary neurotransmitter receptors. En: «Regulatory mechanism of neuron to vessel communication in the brain».

(F. Battaini, S. Govoni, M.S. Magnoni y M. Trabucchi). NATO Asi Series. Series H: Cell Biology. Springer Verlag. Berlin. pp: 145-168.

JOÓ, F. (1992) The cerebral microvesels in culture, an update. J. Neurochem. 58 (1): 1-17.

JORDAN, F.L. y THOMAS, W.E. (1988). Brain macrophages: questions of origin and interrelationship. Brain Res. Rev. 13: 165-178.

JOYCE, N.C.; HAIRE, M.F. y PALADE, G.E. (1985a). Contractile proteins in pericytes. I. Immunoperoxidase localization of tropomyosin. J. Cell. Biol. 100: 1379-1386.

JOYCE, N.C.; HAIRE, M.F. y PALADE, G.E. (1985b). Contractilr proteins in pericytes. II. Immunocytochemical evidence for the presence of two isomyosins in graded concentrations. J. Cell. Biol. 100: 1387-1395.

KALARIA, R.N. y HARIK, S.I. (1988). Adenosine receptors and the nucleoside transporter in human brain vasculature. J. Cereb. Blood flow Metab. 8: 32-39.

KARNOWSKY, M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell. Biol. 27: 137-138.

KARNUSHINA, I.; TOTH, I.; DUX, E. y JOÓ, F. (1980a). Presence of guanylate cyclase in brain capillaries: histochemical and biochemical evidence. Brain Res. 189: 588-592.

KARNUSHINA, I.L.; PALACIOS, J.M.; BARBIMN, G.; JOÓ, F. y SCHWARTZ, J.C. (1980b). Studies on a capillary-rich fraction isolated from brain: histaminic components and characterization of the histamine receptors linked to adenylate cyclase. J. Neurochem. 84 (5): 1201-1208.

KARNUSHINA, I.L.; SPATZ, M. y BEMBRY, J. (1982). Cerebral endothelial cell culture. I. The presence of beta-2 and alpha-2-adrenergic receptors linked to adenylate cyclase activity. Life Sci. 30: 849-858.

KASTIN, A.J.; PEARSON, M.A. y BANKS, W.A. (1991). EEG evidence that morphine and an enkephalin analog cross the blood-brain barrier. Pharmacol. Biochem. Behav. 40 (4): 771-774.

KATO, K.; SUZUKI, F. y SHIZIMU, A. (1986). Highly sensitive immunoassays for rat brain type creatine kinase: determination in isolated Purkinje cells. J. Neurochem. 46: 1783-1788.

KATO, S. y NAKAMURA, H (1987). Ultracytochemical localization of alkaline phosphatase activity in endothelial cells in chronic relapsing experimental allergic encephallomyelitis. Acta Neuropathol (Berl). 73: 220-226.

- KACZMAREK, L.K. y DAVIDSON, A.N. (1972). Uptake and release of taurine from brain slices. *J. Neurochem.* 19: 2355-2367.
- KARMEN, A. (1955). Citado en: Petronio, I. (1960). Sul comportamento di alcuni attivita enzimatiche tessuti (GOT, GPT, Aldolasi, Idrogenasi lattica e deidrogenasi malica). I. Neoplasia mammarie. *Arch. Vecchi. Anal. Pathol. Med. Clin.* XXXIV: 11-20.
- KECK, P.J.; HAUSER, S.D.; KRIVI, G.; SANZO, K.; WARREN, T.; FEDER, J. y CONNOLLY, D.T. (1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246 (4935): 1309-1328.
- KELLY, P.A. y McCULLOCH, J. (1982). Cerebrovascular and metabolic influences of GABA. En: «Cerebral Blood Flow: effects of nerves and neurotransmitters». (D.D. Heistad y M.L. Marcus, eds). Elsevier Biomedical. New York. pp: 243-248.
- KELLY, P.T. y McCULLOCH, J. (1983). The effect of the GABAergic agonist muscimol upon the relationship between local cerebral blood flow and glucose utilization. *Brain Res.* 258: 338-342.
- KETTENMANN, H.; BACKUS, K.H. y SCHACHNER, M. (1988). GABA receptors on cultured astrocytes. En: «Glial Cell Receptor». (H.K. Kimelberg, ed). Raven Press, Ltd. New York, pp: 95-106.
- KITAYAMA, I.; CINTRA, A.; JANSON, A.M.; FUXE, K.; AGNATI, L.F.; ENEROTH, P.; ARONSSON, M.; HÄRFSTRAND, A.; STEINBUSH, H.W.M.; VISSER, T.J.; GOLDSTEIN, M.; VALE, W. y GUSTAFSSON, J.A. (1989). Chronic immobilization stress: evidence for decrease of 5-OH-tryptamine immunoreactivity and for increases of glucocorticoids receptor immunoreactivity in various brain regions of the male rat. *J. Neural. Transm.* 77: 93-130.
- KNOFF, K.; STURMAN, J.A.; ARMSTRONG, M. y HAYES, K.C. (1978). Taurine: an essential nutrient for the cat. *J. Nutr.* 3: 773-778.
- KNYIHAR, E. y LASZLO, I. (1973). Thiamine pyrophosphatase activity in neurotubuli and synaptic vesicle. *Neurobiol.* 3: 327-334.
- KOBAYASHI, H.; MAORET, T.; FERRANTE, M.; SPANO, P.F. y TRABUCCHI, M. (1981a). Subtypes of beta-adrenergic receptors in rat cerebral microvessels. *Brain Res.* 220: 194-198.
- KOBAYASHI, H.; MEMO, M.; SPANO, P.F. y TRABUCCHI, M. (1981b). Identification of beta-adrenergic receptors binding sites in rat brain microvessels, using <sup>125</sup>I Iodohydroxy-benzylpindolol. *J. Neurochem.* 36: 1383-1388.

- KONTRO, P. y OJA, S.S. (1987). Taurine and GABA release from mouse cerebral cortex slices: effects of structural analogues and drugs. *Neurochem. Res.* 12: 475-482.
- KONTRO, P.; KORPI, E.R. y OJA, S.S. (1990). Taurine interacts with GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors in the brain. En: «Taurine: functional neurochemistry, physiology and cardiology». Wiley Liss, Inc. 351: 83-94.
- KONTRO, P. y OJA, S.S. (1990). Interactions of taurine with GABA<sub>B</sub> binding sites in mouse brain. *Neuropharmacology* 29: 243.
- KORTE, G.E.; REINER, A. y KARTEN, H.J. (1980). Substance P-like immunoreactivity in cerebellar mossy and terminals in the red-eared turtle "Chrysemys scripta elegans". *Neuroscience* 5: 903-914.
- KORPI, E.R. y OJA, S.S. (1983). Characteristics of taurine release from cerebral cortex slices induced by sodium deficient media. *Brain Res.* 289: 197-204.
- KOSUNEN, T.U.; WAKSMAN, B.H. y SAMUELSON, I.H. (1963). Radioautographic study of cellular mechanism in delayed hypersensitivity. II. Experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 22: 367-380.
- KRAUSE, D.N.; WONG, E.; DEGENER, P. y ROBERTS, T. (1980). GABA receptors in bovine cerebral blood vessels: binding studies with <sup>3</sup>H-muscimol. *Brain Res.* 185: 51-57.
- KREUTZBERG, G.W. y TOTH, I. (1983). Enzyme cytochemistry of the cerebral microvessel wall. *Acta Neuropathol. (Berl)*. [Suppl VIII]: 35-51.
- KRISTENSSON, K. y OLSSON, Y. (1973). Accumulation of protein tracers in pericytes of the central nervous system following systemic injection in immature mice. *Acta Neurol. Scand.* 49: 189-194.
- KROGH, A. (1919). The number and distribution of capillaries in muscles with calculations of oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *J. Physiol. (Lond)*. 52: 409-415.
- KROGH, A. (1929). The anatomy and physiology of capillaries. Hafner, New York.
- KROGH, A. (1945). The active and passive exchanges of inorganic ions through the surfaces of living cells and through living membranes generally. *Proc. Roy. Soc. B.* 133: 140-200.
- KRUM, J.M. y ROSENSTEIN, J.M. (1988). Patterns of angiogenesis in neural transplant models. II. Fetal neocortical transplant. *J. Comp. Neurol.* 271: 331-345.



- KUBO, T. y KIHARA, M. (1987). Evidence for the presence of GABAergic and glycine-like systems responsible for cardiovascular control in the nucleus tractus solitarii of the rat. *Neurosci. Lett.* 74: 331-336.
- KUBO, T. y KIHARA, M. (1990). Beta-alanine, like glycine, microinjected into the rat nucleus tractus solitarii increases blood pressure. *Clin. Exp. Hyper.* 12 (8): 1351-1360.
- KURIYAMA, K.; HARBER, B. y ROBERTS, E. (1970). Occurrence of a new L-Glutamic acid decarboxylase in several blood vessels rabbit. *Brain Res.* 23: 121-123.
- KURIYAMA, K.; MURAMATSU, M.; NAKAGAMA, K. y KAKITA, K. (1978). Modulating role of taurine on release of neurotransmitters and calcium transport in excitable tissues. En: «Taurine: functional neurochemistry, physiology and cardiology». Wiley Liss Inc., 351: 201-216.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LAFARGA, M. y PALACIOS, G. (1975). Ultrastructural study of pericytes in the rat supraoptic nucleus. *J. Anat.* 120: 433-438.
- LAFARGA, M. y HERVAS, J.P. (1978). Intranuclear inclusions in pericytes in the hypothalamus of the rat. *Cell Tissue Res.* 193: 315-322.
- LAHDESMÄKI, P. y OJA, S.S. (1973). On the mechanism of taurine transport at brain cell membranes. *J. Neurochem.* 20: 1411-1416.
- LAJTHA, A. y SERSHEN, H. (1975a). Changes in amino acid influx with Na<sup>+</sup> flow in incubated slices of mouse brain. *Brain Res.* 84: 429-441.
- LAJTHA, A. y SERSHEN, H. (1975b). Inhibition of amino acid uptake by the absence of Na<sup>+</sup> xlices of brain. *J. Neurochem.* 24: 667-672.
- LAKE, N. y VERDONE-SMITH, C. (1990). Immunocytochemical localization of taurine within glial cell in the optic nerve of adult albino rats. *Current Eye Res.* 9 (11): 1115-1120.
- LAMBERTSON, C.J. (1980). Chemical control of respiration at rest. En: «Medical physiology». (V.B. Mountcastle, ed)., C.V. Mosby, St. Louis, pp: 1774-1827.
- LANDER, A.D.; FUJII, D.K. y REICHARDT, L.F. (1985a). Laminin is associated with the "neurite outgrowth-promoting factors" found in conditioned media. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:

- LANDER, A.D.; FUJU, D.K. y REICHARDT, L.F. (1985b). Purification of a factor that promotes neurite outgrowth: isolation of laminin and associated molecules. *J. Cell. Biol.* 101: 898-913.
- LANE, N.J. (1981). Invertebrate neuroglia - junctional structure and development. *J. Exp. Biol.* 95: 7-33.
- LARSON, D.M.; CARSON, M.P. y HANDEMSCHILD, C.C. (1987). Junctional transfer of small molecules in cultured bovine brain microvascular endothelial cells and pericytes. *Microvasc. Res.* 34: 184-199.
- LARSSON, L.-I. (1988). *Immunocytochemistry: theory and practice*. C.R.C. Press. Boca Raton, Florida.
- LATKER, C.H.; SHINOWARA, N.L.; MILLER, J.C. y RAPOPORT, S.I. (1987). Differential localization of alkaline phosphatase in barrier tissues of the frog and rat nervous systems: a cytochemical and biochemical study. *J. Comp. Neurol.* 264: 291-302.
- LeBEUX, Y.J. y WILLEMOT, J. (1978). Actin-like filaments in the endothelial cells of adult rat brain capillaries. *Exp. Neurol.* 58: 446-454.
- LEE, J.C. (1971). Evolution in the concept of the blood-brain barrier phenomenon. *Progress in Neuropathol* 1: 84-145.
- LEE, T.J.F. (1980). Direct evidence against acetylcholine as the dilator transmitter in the cat cerebral artery. *Eur. J. Pharmacol.* 68: 393-394.
- LEFAUCONIER, J.M. y HAUW, J.J. (1984). La barriere hémato-encéphalique. II. Données physiologiques. *Rev. Neurol.* (Paris). 140 (2): 89-109.
- LERMA, J.; HERRANZ, A.S.; HERRERAS, O.; ABRAIRA, V. y DEL RIO, R.M. (1986). In vivo determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis. *Brain Res.* 384: 145-155.
- LEIN, P.J.; HIGGINS, D.; TURNER, D.C.; FLIER, L.A. y TERRANOVA, V.P. (1991). The NC1 domain of type IV collagen promotes axonal growth in sympathetic neurons through interaction with the  $\alpha_1\beta_1$  integrin. *J. Cell. Biol.* 113: 417-428.
- LI, Y.P. y LOMBARDINI, J.B. (1991). Inhibition by taurine of the phosphorylation of specific synaptosomal proteins in the rat cortex - effects of taurine on the stimulation of calcium uptake in mitochondria and inhibition of phosphoinositide turnover. *Brain Res.* 553 (1): 89-96.

- LINSTEDT, A.D. y KELLY, R.B. (1991). Endocytosis of the synaptic vesicle protein, synaptophysin, requires the COOH-terminal tail. *J. Physiol. (Paris)* 85 (2): 90-96.
- LO, W.D.; McNEELY, D.L. y BOESEL, C.W. (1991). Blood-brain barrier permeability in an experimental model of bacterial cerebritis. *Neurosurg.* 29 (6): 888-892.
- LONG, J.B.; RIGAMONTI, D.D.; DOSAKA, K.; KRAIMER, J.M. y MARTÍNEZ-ARIZALA, A. (1992). Somatostatin causes vasoconstriction, reduces blood flow and increases vascular permeability in the rat central nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260 (3): 1425-1432.
- LÓPEZ-COLOME, A.; TAPIA, R.; SALCEDA, R. y PASANTES-MORALES, H. (1978). K<sup>+</sup>-stimulated release of labelled  $\gamma$ -aminobutyrate, glycine and taurine in slices of several regions of rat central nervous system. *Neuroscience*, 3: 1069-1074.
- LÓPEZ-COLOME, A.M. (1982). Taurine receptors and CNS membranes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 139: 293-310.
- LORENZO, A.V.; FERNANDEZ, C. y ROTH, L.J. (1965). Physiological induced alteration of sulphate penetration into brain. *Arch. Neurol.* 12: 128-132.
- LOU, H.C. y EDVINSSON, L. (1989). Innervation of cerebral vasculature and its putative role in the coupling of flow to metabolism. En: «Regulatory mechanisms of neuron to vessels communication in the brain». (F. Battani, S. Giovoni, M.S. Magnoni y M. Trabuchi, eds). Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg, New York. NATO ASI Series. Series H: Cell Biology 33: 75-95.
- LOWRY, O.H.; ROSEBERG, N.J.; FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- LYONS, M.K.; ANDERSON, R.E. y MEYER, F.B. (1991). Basic fibroblast growth factor promotes in vivo cerebral angiogenesis in chronic forebrain ischemia. *Brain Res.* 558 (2): 315-320.
- MACAIONE, S.; TUCCI, G. y DiGIORGIO, R.M. (1975). Taurine distribution in rat tissues during development. *Ital. J. Biochem.* 24: 162-173.
- MADSEN, P. y PASANTES-MORALES, H. (1978). Taurine in the nervous system. En: «Reviews in Neuroscience». (S. Ehrenpreis e I.J. Kopin, eds). Raven Press, New York. 3: 157-193.
- MADSEN, S.; OTTERSEN, O.P. y STORM-MATHISEN, J. (1985). Immunocytochemical visualization of Taurine: neuronal localization in the rat cerebellum. *Neurosci. Lett.* 60: 255-260.

- MADSEN, S. (1990a). Immunocytochemical visualization of Taurine-containing and taurine-synthesizing cells. En: «Taurine: functional neurochemistry, physiology and cardiology». Wiley Liss Inc. 351: 21-28.
- MADSEN, S.; OTTERSEN, O.P.; STORM-MATHISEN, J. y STURMAN, J.A. (1990b). Immunocytochemical localization of Taurine-methodological aspects. En: «Taurine: functional neurochemistry, physiology and cardiology». Wiley Liss Inc. 351: 37-44.
- MAGISTRETTI, P.J. y MORRISON, J.H. (1988). Noradrenaline- and vasoactive intestinal peptide- containing neuronal synthesis in neocortex: functional convergence with contrasting morphology. *Neuroscience* 24: 367-378.
- MAGNONI, M.S.; GOVONI, S.; BATTAINI, F. y TRABUCCHI, M. (1989). Biochemical changes of brain microvessels during aging. En: «Regulatory mechanism of neuron to vessel communication in the brain». (F. Battaini, S. Govoni, M.S. Magnoni y M. Trabucchi). NATO Asi Series. Series H: Cell Biology. Springer Verlag. Berlin. pp: 169-186.
- MANCARDI, G.L.; PERDELLI, F.; RIVANO, C.; LEONARDE, A. y BUGIANI, O. (1980). Thickening of the basement membrane of cortical capillaries in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 49: 79-85.
- MANN, D.M.A.; PURKISS, M.S.; BONSHEKI, R.E.; JONES, D.; BROWN, A.M.T y SRODDART, R.W. (1992). Lectin histochemistry of cerebral microvessels in ageing, Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Neurobiol. Aging.* 13 (1): 137-144.
- MARCHAND, F. (1898). Uber die bei Entzündung in der peritonealhöhle auftretenden Zellformen. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 1: 63-81.
- MARCO, E.J.; BALFAGON, G.; SALAICES, M.; SANCHEZ-FERRER, C.F. y MARIN, J. (1985). Serotonergic innervation of cat cerebral arteries. *Brain Res.* 338: 137-139.
- MARIN, J.; SALAICES, M. y SANCHEZ, C.L.F. (1979). Release of <sup>3</sup>H-noradrenalin induced by 5-hydroxytryptamine from cat pial arteries. *J. Pharm. Pharmacol.* 31: 818-821.
- MARTIN, D.L.; MADELIAN, V. y SHAIN, W. (1989). Spontaneous- and beta-adrenergic receptor-mediated release of taurine from astroglial cells do not require extracellular calcium. *J. Neurosci. Res.* 23: 191-197.
- MARTIN, D.L. y SHAIN, W. (1979). High-affinity transport of taurine and  $\delta$ -alanine and low-affinity transport of  $\gamma$ -aminobutyric acid by a single transport system in cultured glioma cells. *J. Biol. Chem.* 254: 7076-7084.
- MARTIN, D.L.; SHAIN, W. y MADELIAN, V. (1986). Taurine release

from glial cells is independent of extracellular calcium. Abs. Soc. Neurosci. 12: 167.

MARTIN, D.L.; SHAIN, W. y MADELIAN, V. (1988). Receptor-mediated release of taurine from glial cells and signalling between neurons and glia. En: «Glial Cell Receptors». (H.K. Kimelberg, ed). New York, Raven Press. pp: 183-195.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A. y AMENTA, P. (1983). The basement membrane in pathology. Lab. Invest. 48: 656-677.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, R.; FERNÁNDEZ, B.; CEVALLOS, B. y GONZÁLEZ, M. (1974). Histochemical localization of glutamic dehydrogenase and aspartate aminotransferase in chicken cerebellum. Brain Res. 69: 31-40.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, R.; GARCÍA-SEGURA, L.M. y MARTÍNEZ-MURILLO, R. (1976). Aspartate aminotransferase activity and glutamic acid dehydrogenase in cerebellar cortex in several species of animals. An histochemical study. J. Hirnforsch. 17: 387-397.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, R.; TOLEDANO, A.; GARCÍA-SEGURA, L.M. y MARTÍNEZ-MURILLO, R. (1977). Localization of aspartate aminotransferase and glutamic dehydrogenase in the Edinger-Westphal and oculomotor nuclei of *Lacerta lepida*. Neurosci. Lett. 6: 65-68.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, R.; MARTÍNEZ-MURILLO, R.; TOLEDANO, A. y BARCA, M.A. (1980). A comparative histochemical study of diphosphate nucleosidase and thiamine pyrophosphatase in mammalian hypothalamus. J. Anat. 130: 173-182.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, R.; MARTÍNEZ-MURILLO, R.; CANESCO, M.J. (1982). Histochemical study of aspartate aminotransferase activity in the rat and chicken cerebellum during postnatal development. Cell. Mol. Biol. 28: 521-527.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, R.; ARENAS-DÍAZ, G. y CARNICERO, M.B. (1989). Thiamine-like molecules in the cerebellar cortex of the rat: light and electron microscopic immunocytochemical investigation. J. Neurosci. Res. 23: 447-453.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, R.; TONDA, A.; A, M.L.; GRAGERA, R.R.; PAZ-DOEL, R.; GARCÍA-CORDOVILLA, R.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, E.; FERNÁNDEZ, A.M.; GONZÁLEZ-ROMERO, F.J.; y LÓPEZ-BRAVO, A. (1992). Synaptic and non-synaptic immunolocalization of GABA and Glutamate acid decarboxylase (GAD) in cerebellar cortex of rat, Cell. Mol. Biol. 39. (En prensa).

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, R.; NÁJERA, M.L.; GRAGERA, R.R.; TONDA, A.; GONZÁLEZ-ROMERO, F.J.; FERNÁNDEZ, A.M.; ALONSO, M.J. y LÓPEZ-BRAVO, A. (1993). Axonal and non-axonal immunolocalization of cytosolic aspartate aminotransferase (CAATase), GABA and Glutamic acid decarboxylase (GAD) in the rat cochlear nucleus. J. Hirnforsch 39 (4-5). En

prensa.

- MATZ, H. y HERTZ, L. (1989). Adenosine metabolism in neurons and astrocytes in primary cultures. *J. Neurosci. Res.* 24: 260-264,
- MAYNARD, E.A.; SCHULTZ, R.L. y PEASE, D.C. (1957). Electron microscopy of the vascular bed of rat cerebral cortex. *Am. J. Anat.* 100: 409-434.
- MAXWELL, D.S. y KRUGER, L. (1965). Small blood vessels and the origin of phagocytes in the rat cerebral cortex following heavy particle irradiation. *Exp. Neurol.* 12: 33-54.
- McBRIDE, W.J.; NADI, N.S.; ALTMAN, J. y APRISON, M.H. (1976). Effects of selective doses of X-irradiation on the vessels of several amino acids in the cerebellum of the rat. *Neurochem. Res.* 1: 141-152.
- McBRIDE, W.J. y FREDERICKSON, R.C.A. (1980). Tuarine as a possible inhibitory transmitter in the cerebellum. *Fed. Proc.* 39: 2701-2705.
- MCCANDLESS, D.W. (1982). Energy metabolism in the lateral vestibular nucleus in pyridoxamine-induced thiamine deficiency. *Ann. NY. Acad. Sci. USA.* 378: 355-364.
- MCCULLOCH, J.; UDDMAN, R.; KINGMAN, T.A. y EDVINGSSON, L. (1986). Clacitonin gene-related peptide: functional role in cerebrovascular regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 5731-5735.
- MCDONALD, D.M. y RASMUSSEN, G.L. (1977). An ultrastructural analysis of neurites in the basal lamina in the chinchilla cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 173:475.
- McGEER, P.L. y McGEER, E.G. (1975). Evidence for glutamic acid decarboxylase containing interneurons. *Brain Res.* 91: 331-335.
- McGEER, P.L. y McGEER, E.G. (1989). Aminoacid neurotransmitters. En:«Basic neurochemistry». 4<sup>th</sup>ed. (G. Siegel, B. Agranoff, R.W. Albers y P. Molinoff, eds). Raven Press, New York, pp: 311-332.
- McINTOSH, F.C. (1941). The distribution of acetylcholine in the peripheral and central nervous system. *J. Physiol. (Lond)* 99: 436-442.
- MECOCCHI, P.; PARNETTI, L.; REBOLDI, G.P.; SANTUCCI, C.; GAITI, A.; FERRI, C.; GERNINI, I.; ROMAGNOLI, M.; CADINI, D. y SENIN, U. (1991). Blood-brain barrier in a geriatric population: barrier function in degenerative and vascular dementias. *Acta. Neurol. Scand.* 84 (3): 210-213.
- MEYER, J.; RAUH, J. y GALIA, H.J. (1991). The susceptibility of

- cerebral endothelial cells to astroglial induction of blood-brain barrier enzymes depends on their proliferative state. J. Neurochem. 57 (6): 1971-1977.
- MILICI, A.J. (1987). Transcytosis of albumin in capillary endothelium. J. Cell. Biol. 105: 2603-2612.
- MILLER, F.N. y SIMS, D.E. (1986). Contractile elements in the regulation of macro-molecular permeability. Fed. Proc. 45: 84-88.
- MINZ, B. (1938). Sur la liberation de la vitamine B<sub>1</sub> par le tronc isolé du nerf pneumogastrique soumis a l'excitation électrique. C. R. Soc. Biol. (paris). 127: 1251-1253.
- MIRZOYAN, S.A. y AKOPYAN, V.P. (1967). The effect produced by gamma-aminobutyric acid on the cerebral circulation and oxygen tension in the brain. Farmakol. Toksikol. (USSR). 5: 572-574.
- MIRZOYAN, S.A.; KAZARAN, V.A. y AKOPYAN, V.P. (1970). The glutamic decarboxylase activity in blood vessels of the brain. Dokl. Acad. Nauk. (USSR) 190: 1241-1243.
- MOLLGARD, K. y SAUNDERS, N.R. (1975). Complex tight junctions of epithelial and endothelial cells in aerly foetal brain. J. Neurocytol. 4: 453-468.
- MOORADIAN, A.D.; MORIN, A.M.; CIPP, L.J. y HASPEL, H.C. (1991). Glucose trasnport is reduced in the blood-brain barrier of aged rats. Brain Res. 55 (1-2): 145-149.
- MOORADIAN, A.D. y SMITH, T.L. (1992). The effect of age on lipid composition and order of rat cerebral microvessels. Neurochem Res. 17 (3): 233-237.
- MORI, S. y LEBLOND, C.P. (1969). Identification of microglia in light and electron microscopy. J. Comp. Neurol. 135: 57-80.
- MÜLLER-HERMELINK, H.K. y HANSMANN, M.L. (1984). Immunohistochemical procedures: applications and problems. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22: 953.
- MURPHY, S. y PEARCE, B.R. (1987). Functional receptors for neurotransmitters on astroglial cells. - A commentary. Neuroscience 22: 381-394.
- NAAS, E.; ZILLES, K.; GNAHN, H.; BETZ, H.; BECKER, C.M. y SCHRODER, H. (1991). Glycine receptor immunoreactivity in rat and human cerebral cortex. Brain Res. 561: 139-146.
- NADI, N.S.; McBRIDGE, W.J. y APRISON, M.H. (1977). Distribution of several aminoacids in regions of the cerebellum of the rat. J. Neurochem. 28: 661-662.
- NAG, S.; ROBERTSON, D.M. y DINSDALE, H.H. (1979). Quantitative

- estimate of pinocytosis in experimental acute hypertension. *Acta Neuropathol.* 46: 107-116.
- NAG, S. (1985). Ultrastructural localization of monossacharide residues on cerebral endothelium. *Lab. Invest.* 52: 553-558.
- NAG, S. (1987a). Ultrastructural localization of calcium-activated adenosine triphosphatase ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase). in cerebral endothelium. *Lab. Invest.* 57: 52-56.
- NAG, S. y HARIK, S.I. (1987b). Crebrovascular permeability to horseradish peroxidase in hypertensive rats: effects of unilateral locus coeruleus lession. *Acta Neuropathol.* (Berl). 73: 247-253.
- NAG, S. (1988). Localisation of calcium-activated adenosine-triphosphatase ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) in intracerebral arterioles in acute hypertension. *Acta Neuropathol.* (Berl). 75: 543-553.
- NAG, S. (1991) Protective effect of flunarizine on blood brain barrier permeability alterations in acutely hypertensive rats. *Stroke* 22 (10): 1265-1269.
- NAGY, Z.; PETERS, H. y HÜTTNER, I. (1983). Charge-related alterations of the cerebral endothelium. *Lab. Invest.* 50: 313-322.
- NAKAGAWA, M.; INOUE, A.; TOYODA, T.; SAWADA, S.; UNO, M. Y TAKEDA, K. (1990). Central antihypertensive effect of taurine. En: «Taurine: functional neurochemistry, physiology and cardiology». Wiley Liss, Inc. 351: 463-470.
- NATHANSON, J.A. y GLASER, G.H. (1979). Identification of beta-adrenergic-sensitive adenylate cyclase in intracranial blood vessels. *Nature* 278: 567-569.
- NATHANSON, J.A. (1980). Cerebral microvessels contain a beta-2-adrenergic receptor. *Life Sci.* 26: 1793-1799.
- NATHANSON, J.A. y GLASER, G.H. (1979). Identification of  $\beta_2$ -adrenergic-sensitive adenylate cyclase in intracranial blood vessels. *Nature* 278: 567-569.
- NITSCH, C y KLATZO, I. (1983). Regional patterns of blood-brain barrier during epileptiform seizures induced by various convulsive agents. *J. Neurol. Sci.* 59: 305-322.
- NOBLE, L.J. y WRATHALL, J.R. (1987). The blood-spinal cord barrier after injury: pattern of vascular events proximal and distal to transection in the rat. *Brain Res.* 424: 177-188.
- OJA, S.S. y KONTRO, P. (1983). Taurine. En: «Habdbbook of neurochemistry». (A. Lajtha, ed). Plenum Press, New York. 3: 501-533.



- OJA, S.S. y KONTRO, P. (1987). Cation effects on taurine release from brain slices: comparison to GABA. *J. Neurosci. Res.* 17: 302-311.
- OJA, S.S. y KONTRO, P. (1990). Neuromodulatory and trophic actions of Taurine. En: «Taurine: functional neurochemistry, physiology and cardiology». Wiley Liss Inc. 351: 69-76.
- OKAMOTO, K. y NAMINA (1978). Uptake, release and hetero-exchange diffusions of inhibitory aminoacids in guinea pig cerebellar slices. *J. Neurochem.* 31: 1393-1402.
- OKAMOTO, K. y SAKAI, Y. (1979). Augmentation by chlorodiazepoxide of the inhibitory effects of taurine,  $\beta$ -alanine and  $\gamma$ -aminobutyric acid on spike discharges in guinea pig cerebellar slices. *Br. J. Pharmacol.* 65: 277-285.
- OKAMOTO, K.; KIMURA, H. y SAKAI, Y. (1983a). Evidence for taurine as inhibitory neurotransmitter in cerebellar stellate interneurons: selective antagonism by TAG. *Brain Res.* 265: 163-168.
- OKAMOTO, K.; KIMURA, H. y SAKAI, Y. (1983b). Taurine induced increase of the  $\text{Cl}^-$  conductance of cerebellar Purkinje cell dendrites in vitro. *Brain Res.* 259: 319-323.
- OKAMOTO, K.; KIMURA, H. y SAKAI, Y. (1983c). Effects of taurine and GABA on  $\text{Ca}^{2+}$  spikes in cerebellar Purkinje cells dendrites in vitro. *Brain Res.* 259: 319-359.
- OLAH, Z. (1988). Kinetics of protein phosphorylation in microvessels isolated from rat brain: modulation by second messengers. *J. Neurochem.* 51: 49-56.
- OLENDORF, W.H. y SZABO, J. (1976). Amino acid assignment to one of the three blood-brain barrier amino acids carriers. *Am. J. Physiol.* 230: 94-98.
- OLENDORF, W.H.; CORNFORD, M.E. y BROWN, W.J. (1977a). The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann. Neurol.* 1: 409-417.
- OLENDORF, W.H. (1984). The blood-brain barrier. En: «Handbook of Neurochemistry». Second edition. (A. Lajtha, ed). Chapter 16, pp: 485-498.
- OLESEN, S.P. y CRONE, C. (1983). Electrical resistance of muscle capillary endothelium. *Biophys. J.* 42: 31-41.
- OLSON, J.J. (1988). Methylprednisolone reduces the bulk flow of water across and in vitro blood-brain barrier. *Brain Res.* 439: 259-265.

- ORKIN, R.W.; GEHRON, P.; MCGOODWIC, E.B.; MARTIN, G.P.; VALENTINE, T. y SWARM, R. (1977). A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J. Exp. Med.* 145: 204-220.
- ORLIDGE, A. y D'AMORE, P.A. (1987). Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J. Cell. Biol.* 105: 1455-1462.
- ORLIDGE, A.; SMITH, S. y D'AMORE, P.A. (1988). Co-cultures of endothelial cells and pericytes produce activated TGF- $\beta$ . *J. Cell. Biol.* 107: 504 (abstract).
- ORLOWSKI, M.; SESSA, G. y GREEN, J.P. (1974).  $\gamma$ Glutamyl transpeptidase in brain capillaries: possible site of a blood-brain barrier for amino acids. *Science* 184: 66-68.
- OTTERSEN, O.P. (1988a). Quantitative assesment of taurine-like immunoreactivity in different cell types and processes in rat cerebellum: an electron microscopic study based on a postembedding immunogold labelling procedure. *Anal. Embriol.* 178: 407-421.
- OWMAN, C.H. y EDVINSSON, L. (1977). Histochemical and pharmacological approach to the investigation of neurotransmitters, with particular regard to the cerebrovascular bed. En: «Neurogenic control of brain circulation». Proceedings of the International Symposium held in the Wenner-Gren Center, Stockholm. (Ch. Owman y L. Edvinsson, eds). pp: 15-39.
- OWMAN, C.H.; EDVINSSON, L.; HARDEBO, J.E.; GRÖSCHEL-STEWART, U.; UNSICKER, K. y WALLE, B. (1977). Immunohistochemical demonstration of actin and myosin in brain capillaries. En: «Cerebral function, metabolism and circulation». (D.H. Ingvar. y N.A. Lassen, eds). Copenhagen, Munksgaard. pp:384-385.
- PALAY, S.L. y CHAN-PALAY, V. (1975). Cerebellar cortex: cytology and organization. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, New York.
- PALMER, G.C. y PALMER, S.J. (1978). 5'-guanylyl-imidodiphosphate actions on adenylate cyclase in homogenates of rat cerebral cortex plus neuronal and capillary fractions. *Life Sci.* 23: 207-216.
- PALMER, G.C. (1979). Diminished adenylate cyclase responses in frontal cortex and cerebral capillaries of spontaneously hypertensive rats. *Biochem. Pharmacol.* 28: 2847-2849.
- PALMER, G.C. (1981a). Regional distribution of neurohumoral responsive adenylate cyclase in rabbit brain microvessels. *Neurosci. Lett.* 21 (2): 207-210.
- PALMER, G.C. (1981b). Distribution of guanylate cyclase in rat cerebral cortex: neuronal, glial, capillary, pia arachnoid

and synaptosomal fractions plus choroid plexus. *Neurosci.* 6: 2547-2553.

PALMER, G.C. y CHAI, G. (1982). Adenosine receptors in capillaries and pia-arachnoid of rat cerebral cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 81: 129-132.

PALMER, G.C.; JONES, D.J.; PALMER, S.J.; CHRISTIE-POPE, B.C. y POULAKOS, L. (1986). Further probes into the molecular sites of damage to cerebral adenylate cyclase following post-ischemic reperfusion. *Neurochem. Path.* 5: 1-24.

PALMER, G.C.; MCCREEDY, S.A. y FREEDMAN, L.R. (1989). Neurotransmitter coupled responses in the microvasculature of the brain under normal and pathological conditions. En: «Regulatory mechanism of neuron to vessel communication in the brain». (F. Battaini, S. Govoni, M.S. Magnoni y M. Trabucchi). NATO Asi Series. Series H: Cell Biology. Springer Verlag. Berlin. pp: 113-143.

PAPPIUS, H.M.; DADOUN, R. y MCHUGH, M. (1988). The effect of p-chlorophenylalanine on cerebral metabolism and biogenic amine content on traumatised brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 8: 324-334.

PARDRIDGE, W.M. y OLENDORF, W.H. (1975). Kinetics analysis of blood-brain barrier transport of amino acids carriers. *Am. J. Physiol.* 221: 1622-1639.

PARDRIDGE, W.M. (1983a). Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier. *Physiological Reviews* 63 (4): 1481-1535.

PARDRIDGE, W.M. (1983b). Neuropeptides and the blood-brain barrier. *Ann. Rev. Physiol.* 45: 73-96.

PARDRIDGE, W.M.; EISENBERG, J. y YANG, J. (1985a). Human blood-brain barrier insulin receptor. *J. Neurochem.* 44: 1771-1778.

PARDRIDGE, W.M.; YANG, J. y EISENBERG, J. (1985b). Blood-brain barrier protein phosphorylation and dephosphorylation. *J. Neurochem.* 45: 1141-1147.

PARDRIDGE, W.M.; EISENBERG, J. y YAMADA, T. (1985c). Rapid sequestration and degradation of somatostatin analogues by isolated brain microvessels. *J. Neurochem.* 44: 1178-1184.

PARDRIDGE, W.M.; OLENDORF, W.H.; CANCELLA, P.A. y FRANK, H.J.L. (1986a). Blood-brain barrier: interface between internal medicine and the brain. *Ann. Intern. Med.* 105: 82.

PARDRIDGE, W.M. (1988a). New direction in the blood-brain barrier research. En: «Fourth colloquium in biological sciences: blood-brain transfer». (F.L. Strand, ed). *Annals of the New York Acc. Scien.* pp: 50-60.

- PARDRIDGE, W.M. (1988b). Recent advances in blood-brain barrier transport. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 28: 25-39.
- PARDRIDGE, W.M. (1991). Advances in cell biology of the blood-brain barrier transport. *Semin. Cell. Biol.* 2 (6): 419-426.
- PARNAVELAS, J.G.; KELLY, W. y BURNSTOCK, G. (1985). Ultrastructural localization of choline acetyltransferase in vascular endothelial cells in rat brain. *Nature* (London). 316: 724-725.
- PARSON, A.A.; WHALLEY, E.T.; FENIUK, W.; CONNOR, H.E. y HUMPHREY, P.P.A. (1989). 5HT<sub>1</sub> like receptors mediate 5-hydroxytryptamine induced contraction of human isolated basilar artery. *Br. J. Pharmacol.* 96: 434.
- PASANTES-MORALES, H.; SALCEDA, R. y LOPEZ-COLOME, A.M. (1978). Taurine in normal retina. En: «Taurine and neurological disorders». (A. Barbeau y R.J. Huxtable, eds). Raven Press, New York. pp: 265-279.
- PASANTES-MORALES, H. y SCHOUSBOE, A. (1988). Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as an osmoeffector. *J. Neurosci. Res.* 20: 505-509.
- PASANTES-MORALES, H. y SCHOUSBOE, A. (1989). Release of taurine from astrocytes during potassium-evoked swelling. *GLIA* 2: 45-50.
- PASANTES-MORALES, H. y MARTIN del RIO, R. (1990). Taurine and mechanisms of cell volume regulation. En: «Taurine: functional neurochemistry, physiology and cardiology». Wiley Liss, Inc. 351: 317-328.
- PASANTES-MORALES, H.; MORAN, J. y SCHOUSBOE, A. (1990a). Taurine release associated to cell swelling in the nervous system. En: «Taurine: functional neurochemistry, physiology and cardiology». Wiley Liss, Inc. 351: 396-376.
- PASANTES-MORALES, H.; MORAN, J. y SCHOUSBOE, A. (1990b). Volume-sensitive release of taurine from cultured astrocytes: properties and mechanisms. *GLIA* 3: 427-432.
- PAULSON, O.B. y NEWMAN, E.A. (1987). Does the release of potassium from astrocyte and feet regulate cerebral blood flow? *Science* 237: 896-898.
- PAZDERMIK, T.L.; WADE, J.V.; NELSON, S.R. y SAMSON, F.E. (1990). Is taurine involved in cerebral osmoregulation? En: «Taurine: functional neurochemistry, physiology and cardiology». Wiley Liss, Inc. 351: 377-384.
- PEARLMUTTER, A.F.; SZKRYBALO, M.; KIM, Y. y HARIK, S.I. (1988). Arginine vasopressin receptors in pig cerebral microvessels, cerebral cortex and hippocampus. *Neurosci. Lett.* 87: 121-126.

- PERLMUTTER, L.S.; CHUI, H.C.; SAPERIA, D. y ATHARIKAR, J. (1990a). Microangiopathy and the colocalization of heparan sulfate proteoglycan with amyloid in senile plaques of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 508: 13-19.
- PERLMUTTER, L.S. y CHANG CHUI, H. (1990b). Microangiopathy, the vascular basement membrane and Alzheimer's disease: a review. *Brain Res. Bull.* 24: 677-686.
- PERLMUTTER, L.S.; BARON, E. y CHANG CHUI, H. (1990c). Morphological association between microglial and senile plaque amyloid in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 119: 32-36.
- PERLMUTTER, L.S.; BARON, E.; SAPERIA, D. y CHUI, H.C. (1991). Association between vascular basement membrane components and the lesions of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 30 (4): 673-681.
- PEROUTKA, S.J.; MOSKOWITZ, M.A.; REINHARD, J.F. y SNYDER, S.H. (1980). Neurotransmitter receptor binding in bovine cerebral microvessels. *Science* 208: 610-612.
- PEROUTKA, S.J.; NOGUCHI, M.; TOWER, D.J. y ALLEN, G.S. (1983). Serotonin-induced contraction of canine basilar artery: mediation by 5-HT<sub>1</sub> receptors. *Brain Res.* 259: 327.
- PERRA, T.L.; KISH, S.J. y HANSEN, S. (1979).  $\gamma$ -vinyl gaba: effect of chronic administration on the metabolism of GABA and other amino compounds in rat brain. *J. Neurochem.* 32: 1641-1645.
- PETERS, A.; PALAY, S.L. y WEBSTER, H de F. (1976). The fine structure of the nervous system: the nervous and supporting cells. Philadelphia: W.B. Saunders. (ed).
- PETRUSZ, P.; SAR, M.; ORDRONNEAU, D. y DIMEO, P. (1976). Specificity in immunocytochemical staining. *J. Histochem. Cytochem.* 24: 1110-1112.
- PETRUSZ, P.; ORDRONNEAU, D. y FINLEY, C.W. (1980). Criteria of reliability for light microscopic immunocytochemical staining. *Histochem. Journal* 12: 333-338.
- PHILLIPS, J.W. y WU, P.H. (1981). The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.* 16: 187-239.
- PICKEL, V.M.; CHAN, J. y GANTEN, D. (1986). Dual peroxidase and colloidal gold labelling study of angiotensin converting enzyme and angiotensin-like immunoreactivity in the rat subfornical organ. *J. Neurosci.* 6: 2457-2469.
- POURCHO, R.G. y OWCZARZAK, M.T. (1991). Glycine receptor immunoreactivity is localized at amacrine synapses in cat retina. *Visual Neurosci.* 7 (6): 611-618.

- POURCHO, R.G., GOEBEL, D.J.; JOJICH, L. y HAZLETT, J.C. (1992). Immunocytochemical evidence for the involvement of glycine in sensory centers of the rat brain. *Neurosci.* 46 (3): 643-656.
- POWELL, E.M.; SOBARZO, M.R. y SALTZMAN, W.M. (1990). Controlled release of nerve growth factor from a polymeric implant. *Brain Res.* 515: 309-311.
- PRESKORN, S.H.; HARTMAN, B.K.; RAICHLE, M.E.; SWANSON, L.W. y CLARK, H.B. (1980). Central regulation of cerebral microvascular permeability and blood flow: pharmacologic evidence. *Adv. Exp. Med. Biol.* 131: 127-138.
- PRESKHORN, S.H.; HARTMAN, B.K.; IRWIN, G.H. y HUGES, C.W. (1982). Role of the central adrenergic system in mediating amitriptyline-induced alteration in mammalian blood-brain barrier in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 223: 288-295.
- QUINN, M.R. (1990). Taurine allosterically modulates binding sites of the GABA<sub>A</sub> receptor. En: «Taurine: functional neurochemistry, physiology and cardiology». Wiley Liss, Inc. 351: 121-127.
- RAICHLE, M.E.; HARTMAN, B.K.; EICHLING, J.O. y SHARP, L.G. (1975). Central noradrenergic regulation of cerebral flow and vascular permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72 (9): 3726-3730.
- RAICHLE, M.E. y GRUBB, R.L. (1978). Regulation of brain water permeability by centrally-released vasopresin. *Brain Res.* 143: 191-194.
- RAICHLE, M.E.; GRUBB, R.L. y EICHLING, J.O. (1978). Central neuroendocrine regulation of brain water permeability. *Ciba Found Symp.* 56: 219-235.
- RAMÓN y CAJAL, S. (1898). La red superficial de las células nerviosas centrales. *Revista trimestral micrográfica III*, 199-204.
- RAMÓN y CAJAL, S. (1909). Cervelet, structure de l'écorce cerebellouse. En: «Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés». Tomo II. Molaine-Paris. Nueva edición preparada por el Instituto S. Ramón y Cajal. Madrid. 1955.
- RAMÓN y CAJAL, S. (1911). Reactions degeneratives des cellules de Purkinje du cervelet sous l'action du traumatisme. *Bol. de la Soc. de Biol. Seance. du 21 Avril*.
- RAMÓN y CAJAL, S. (1912). Histologie du système Nerveux de l'homme et des vertébrés. Vol. II. Maloine. Paris.
- RAPOPORT, S.I. (1976). Blood-brain barrier in physiology and medicine. New York., Raven Press, pp: 83-84.

- RASSIN, D.K. y GAULL, G.E. (1975). Subcellular distribution of enzymes of transmethylation and transsulphuration in rat brain. *J. Neurochem.* 24: 969-978.
- RAUSCH, W.D.; ROSSMANITH, W.; GRUBBER, J.; RIEDERER, P.; JELLINGER, K. y WEISER, M. (1983). Studies on the neurotransmitter binding to pig brain microvessels. *J. Neural. Transm. (Suppl.)* 18: 33-44.
- REA, M.W.; MCBRIDE, W.J. y RHODE, B.H. (1980). Regional and synaptosomal levels of aminoacid neurotransmitters in the 3-acetylpyridine deafferented rat cerebellum. *J. Neurochem.* 34: 1106-1108.
- REESE, T.S. y KARNOVSKY, M.J. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell. Biol.* 34: 207-217.
- REINHARD, J.F.; LIEBMANN, J.E.; SCHOLBERG, A.J. y MOSCOVITZ, M.A. (1979). Serotonin neurons project to small blood vessels in the brain. *Science* 206: 85-87.
- REIRH, J.; ERMISCH, A.; DIEMER, N.H. y GJEDDE, A. (1987). Saturable transport of vasopressin by hippocampus vessels in vivo, associated with inhibition of blood-brain transfer of large neutral amino acids. *J. Neurochem.* 49: 1471-1479.
- REIS, P.J. (1984). Central neural control of cerebral circulation and metabolism. En: «Neurotransmitters and the cerebral circulation». (E.T. Mackenzie, J. Seylaz y A. Bes, eds.). Raven Press. New York. pp: 91-119.
- RENNELS, M.L. y NELSON, E. (1975). Capillary innervation in the mammalian central nervous system. *Am. J. Anat.* 144: 233-241.
- RENNELS, M.L.; GREGORY, J.F. y FUJIMOTO, K. (1983). Innervation of capillaries by local nervous in the cat hypothalamus: a study with horseradish peroxidase. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 219: 60-63.
- REYNOLDS, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH an electronopaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17: 208-212.
- RHODIN, J.A.G. (1968). Ultrastructure of mammalian venous capillaries, venules and small collecting veins. *J. Ultrastruct. Res.* 25: 452-500.
- RISAU, W.; HALMANN, R.; ALBRECHT, U. y HENKE-FAHLE, S. (1986a). Brain induces the expression of an early cell surface marker for blood-brain barrier-specific endothelium. *EMBO. J.* 5: 3179-3183.
- RISAU, W.; HALMANN, R. y ALBRECHT, U. (1986b). Differentiation-dependent expression of proteins in brain endothelium

- during development of the blood-brain barrier. *Dev. Biol.* 117: 537-545.
- RISAU, W. (1987). Endothel, angiogenese und metastasierung. *Onkologie* 10: 260-262.
- RISAU, W. y ZERWES, H. -G. (1989). Role of growth factors in the formation of blood vessels. *Zeitschrift für Kardiologie* 78 (6): 9-11.
- RISAU, W y WOLBURG, H. (1990). Development of the blood-brain barrier. *Trends in Neurosciences* 13 (5): 174-178.
- RISAU, W. y WOLBURG, H. (1991). The importance of the blood-brain barrier in fetuses and embryos. Reply. *Trends in Neurosciences* 14 (1): 15.
- RISTORI, M.T. y VERDETTI, J. (1991). Effects of taurine on rat aorta in vivo. *Fundamental Clin. Pharmacol.* 5 (3): 245-258.
- ROSENSTEIN, J.M. (1987). Neocortical transplants in the mammalian brain lack a blood-brain barrier to macromolecules. *Science* 881: 772-774.
- ROSENSTEIN, J.M.; KRUM, J.M.; STERNBERGER, L.A.; PULLEY, M.I. y STERBERGER, N.H. (1992). Immunocytochemical expression of the endothelial barrier antigen (EBA). during brain angiogenesis. *Dev. Brain Res.* 66 (1): 47-54.
- ROUGET, C. (1873). Memoire sur le developpement, la structure et les proprietes physiologiques des capillaries sanguins et lymphatiques. *Arch. Physiol. Norm. Pathol.* 5: 603-663.
- ROUGET, C. (1879). Sur la contractilite des capillaries sanguins. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*. 88: 916-918.
- ROY, C.W. y SHERRINGTON, C.S. (1890). On the regulation of the blood supply of the brain. *J. Physiol. (Lond.)*. 11: 85-108.
- SAKALLI, O.; PELTE, M.F.; PECLET, M.C.; GABBIANI, G.; GUGLIOTTA, P.; BUSSOLATTI, G.; RAVAZZOLA, M. y ORCI, L. (1989).  $\alpha$ -smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cell is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J. Histochem. Cytochem.* 37: 315-321.
- SÁNCHEZ-OLEA, R. y PASANTES-MORALES, H. (1990). Chloride dependence of the  $K^+$ -stimulated release of Taurine from synaptosomes. *Neurochem. Res.* 15 (5): 535-540.
- SANTOS-BENITO, F.F. y GONZÁLEZ, J.L. (1985). Decrease of choline acetyltransferase activity of rat cortex capillaries with aging. *J. Neurochem.* 45: 633-636.
- SARMENTO, A.; BORGES, N. y AZEVEDO, I. (1991). ADrenergic influence on the control of blood-brain barrier permeability. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of*



- Pharmacology. 343 (6): 633-637.
- SASTRY, B.V.R. y SADAVONGVIVAD, C. (1979). Cholinergic system in nonnervous tissues. Pharmacol. Rev. 30: 65-132.
- SATO, Y. y RIFKIN, D.B. (1989). Inhibition of endothelial movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor- $\beta$ 1-like molecule by plasmin during co-culture. J. Cell. Biol. 109: 309-315.
- SAUNDERS, N.R. (1977). Ontogeny of the blood-brain barrier. En: «The ocular and cerebrospinal fluid». (L.Z. Bito, H. Davson y J.D. Fenstermacher, eds). Exp. Eye Res. 25 (Suppl): 523-550.
- SCHAFER, D.F. y JONES, E.A. (1982) Hepatic encephalopathy and the gamma aminobutyric acid neurotransmitter system. Lancet 198: 18-19.
- SCHAFER, D.F.; FOWTER, F.M.; MUNSON, P.J.; THAKUR, A.K.; WAGGONER, J.G. y JONES, E.A. (1983). Gamma-aminobutyric acid and benzodiazepine receptors in an animal model of fulminant hepatic failure. J. Lab. Clin. Med. 102: 870-880.
- SCHAFER, D.F.; PAPPAS, S.C.; BRODY, L.E.; JACOBS, R. y JONES, E.A. (1984). Visual evoked potentials in a rabbit model of hepatic encephalopathy. Gastroenterology 86: 540-545.
- SCHAFFER, S.W.; ALLO, S.; ARADA, H. y AZUMA, J. (1990). Regulation of calcium homeostasis by taurine- role of calmodulin. En: «Taurine: functional neurochemistry, physiology and cardiology». Wiley Liss, Inc. 351: 217-225.
- SCHALTENBRAND, B. y BAILEY, P. (1928). Die pervaskulare piagliamembran des gehirns. J. Psychol. Neurol. 35: 199.
- SCHEIBEL, A.B. (1984). Changes in brain capillary structure in aging and dementia. En: «Senile dementia: outlook for the future». (J. Wertheimer y M. Marrois, eds) Alan R. Liss, New York. pp: 137-149.
- SCHIVERS, R.R. (1979). Effect of hyperglycemia on brain capillary permeability in the Lizards "Anolis carolensis". Brain Res. 170: 509-522.
- SCHMIDLEY, J.W. y WISSIG, S.L. (1986). Basement membrane of Central Nervous System capillaries lacks ruthenium re-staining sites. Microvasc. Res. 32: 300-314.
- SCHMIEDEN, V.; KUHSE, J. y BETZ, H. (1992). Agonist pharmacology of neonatal and adult glycine receptor alpha subunits: identification of aminoacid residues involved in taurine activation. EMBO. J. 11 (6): 2025-2032.
- SCHOFFENIELS, E. (1985). Thiamine triphosphatase as specific operating substance in axonal conduction. En: «Molecular

basis of nerve activity». (J.P. Changeaux, F. Hucho, A. Maelicke, E. Neumann, eds). Walter de Gruyter, Berlin, New York, pp: 401-427.

SCHOFIELD, P.K.; SWALES, L.S. y TREHERNE, J.E. (1984). Potentials associated with the blood-brain barrier of an insect: recordings from identified neuroglia. *J. Exp. Biol.* 109: 307-318.

SCHON, F. e IVERSEN, L. (1972). Selective accumulation of <sup>3</sup>H-GABA by stellate cells in rat cerebellar cortex in vitro. *Brain Res.* 42: 503-507.

SCHOUSBOE, A. y PASANTES-MORALES, H. (1989). Potassium-stimulated release of <sup>3</sup>H-aurine from cultured GABAergic and glutamaergic neurons. *J. Neurochem.* 53 (4): 1309-1316.

SCHULMAN, J.A.; FINGER, T.E.; BRACHA, N.C. y KARTEN, H.J. (1981). Enkephalin immunoreactivity in Golgi cells and mossy fibers of the mammalian, avian, amphibian and teleost cerebellum. *Neuroscience* 6: 2407-2416.

SCHULMAN, J.A. (1983). Chemical neuroanatomy of the cerebellar cortex. En: «Chemical neuroanatomy». (P.C. Emson, ed). Raven Press, New York, pp: 209-228.

SCHUTZ, W.; STEURER, G. y TUISL, E. (1982). Functional identification of adenylate cyclase-coupled adenosine receptors in rat brain microvessels. *Eur. J. Pharmacol.* 85: 177-184.

SCHWEIGER, U.; BROOKS, A.; TUSCHI, R.J. y PIRKE, K.M. (1989). Serotonin turnover in rat brain during semistarvation with high-protein and high-carbohydrate diets. *J. Neural. Trasm.* 77: 131-139.

SEITANIDOU, T.; NICOLA, M.A.; TRILLER, A. y KORN, H. (1991). Immunohistochemical localization of glycine receptors and a linked polypeptide in the goldfish brain. *J. Receptor Res.* 11 (1-4): 359-370.

SEYLE, H. (1966). Stress in health and disease. Burtterworths, London.

SHAIN, W.G. y MARTIN, D.L. (1984). Activation of  $\beta$ -adrenergic receptors stimulates taurine release from glial cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* 4: 191-196.

SHAIN, W. y MARTIN, D.L. (1990). Uptake and release of taurine - An overview. En: «Taurine: functional neurochemistry, physiology and cardiology». Wiley Liss, Inc. 351: 243-252.

SHAIN, W.; MADELIAN, V.; WANIEWSKI, R.A. y MARTIN, D.L. (1990). Characteristics of taurine release from astroglial cells. En: «Taurine: functional neurochemistry, physiology and cardiology». Wiley Liss, Inc. 351: 299-306.

- SHARKEY, J. y McCULLOCH, J. (1985a). Relationship between local cerebral blood flow and glucose utilization with selective dopamine receptor agonist. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 5 (Suppl.): 537-538.
- SHARKEY, J. y McCULLOCH, J. (1985b). Relationship between local cerebral blood flow and glucose utilization with selective dopamine receptor agonists. En: «Brain: Scientific Abstracts». (D.H. Ingvar, C. Owman y B.K. Siesjö, eds). Lund, studentlitteratur, Vol. 5, pp: 250.
- SHARMA, H.S. y DEY, P.K. (1986). Probable involvement of 5-HT in increased permeability of blood-brain barrier under heat stress in young rats. *Neuropharmacol.* 25: 161-167.
- SHARMA, H.S. y DEY, P.K. (1988). EEG Changes following increased blood-brain barrier permeability under long-term immobilization stress in young rats. *Neurosci. Res.* 5: 224-239.
- SHARMA, H.S.; OLSSON, Y. y DEY, P.K. (1990). Changes in blood-brain barrier and cerebral blood flow following elevation of circulating serotonin level in anesthetized rats. *Brain Res.* 517 (1-2): 215-223.
- SHARMA, H.S.; CERVOS-NAVARRO, J. y DEY, P.K. (1991). Increased blood-brain barrier permeability following acute short term swimming exercise in conscious normotensive young rats. *Neurosci. Res.* 10: 211-221.
- SHAVER, S.W.; SPOSITO, N.M. y GROSS, P.M. (1990). Quantitative fine structure of capillaries in subregions of the rat subfornical organ. *J. Comp. Neurol.* 294: 145-152.
- SHAW, C.M y CARLSON, C.B. (1970). Crystalline structures in globoid-epithelial cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 29: 306-319.
- SHERIDAN, J.D. y LARSON, D.M. (1982). Junctional communication in the peripheral vasculature. En: «Functional Integration of Cells in Animal Tissues». (J.D. Pitt y M.E. Finbow, eds). Cambridge University Press, New York, pp: 263-283.
- SHIVERS, R.R.; BOWMAN, P.D. y MARTIN, K. (1985). A model for the novo synthesis and assembly of tight intercellular junctions. Ultrastructural correlates and experimental verification of the model revealed by freeze-fracture. *Tissue Cell* 17: 417-440.
- SIEGHART, W. y HECKEL, K. (1976). Potassium-evoked release of taurine from synaptosomal fractions of rat cerebral cortex. *Brain Res.* 116: 538-543.
- SOKOLOFF, L. (1988). Measurement of regional hemodynamic and metabolic changes in the central nervous system with imaging techniques. En: «Regulatory mechanisms of neuron to

vessels communication in the brain». (F. Battani, S. Giovoni, M.S. Magnoni y M. Trabuchi, eds). Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg, New York. NATO ASI Series. Series H: Cell Biology 33: 345-392.

SPATZ, M. (1984). Attenuated blood-brain barrier. En: «Handbook of Neurochemistry». Second edition. (A. Lajtha, ed). Chapter 16, pp: 501-544.

SPATZ, M. (1986). Recent advances in the study of cerebrovascular receptors. En: «Mechanisms of secondary brain damage». (A. Baethmann, K.G. Go y A. Unterber, eds). Plenum Publishing, New York. pp: 283-294.

SPECTOR, R. (1977). Vitamin homeostasis in the Central Nervous System; seminar in medicine. N. Engl. J. Med. 296: 1393-1398.

SPECTOR, R. (1982). Thiamine homeostasis in the Central Nervous System. Ann. NY. Acad. Sci. USA. 378: 344-353.

SPETH, R.C. y HARIK, S.I. (1985). Angiotensin II receptors binding sites in brain microvessels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 6340-6343.

STARR, M.S. (1973). Effects of changes in the ionic composition of the incubation medium of the accumulation and metabolism of  $^3\text{H}$ - $\gamma$ -aminobutyric acid and  $^{14}\text{C}$ -Taurine in isolated rat retina. Biochem. Pharmacol. 22: 1693-1700.

STAUBER, W.T.; ONG, S. -H. y MCCUSKEY, R.S. (1981). Selective extravascular escape of albumin into cerebral cortex of the diabetic rat. Diabetes 30: 500-503.

STENSAAS, L.J. y STENSAAS, S.S. (1968). Astrocyte neuroglial cells, oligodendrocytes and microgliaocytes in the spinal cord of the toad. II. Electron microscopy. Z. Zellforsch. 86: 184-214.

STENSAAS, L.J. (1975). Pericytes and perivascular microglial cells in the basal forebrain of the neonatal rabbit. Cell. Tissue Res. 158: 517-541.

STERNBERGER, L.A.; HARDY, P.H.; CUCULIS, J.J. y MEYER, H.C.T. (1970). The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complexes (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of Spirochetes. J. Histochem. Cytochem. 18: 315-333.

STERNBERGER, L.A. (1979). Immunocytochemistry. 2<sup>nd</sup> Ed., John Wiley & Sons, New York. pp: 104-169.

STEWART, P.A. y WILEY, M.J. (1981). Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick

transplantation chimeras. Dev. Biol. 84: 183-192.

STEWART, P.A.; MAGLIOCCO, M.; HAYAKAWA, K.; FARREL, C.L.; DelMAESTRO, C.F.; GIRVIN, J.; KAUFMANN, J.C.E.; VINTERS, H.V. y GILBERT, J. (1987). A quantitative analysis of the blood-brain barrier ultrastructure in the aging human. Microvasc. Res. 33: 270-282.

STORM-MATHISEN, J. y OTTERSEN, O.P. (1986). Antibodies against amino acid neurotransmitter. En: «Neurochemistry: modern methods and applications». (P. Panula, H. Paivarinta y S. Soinila, eds). Alan R Liss, New York. pp: 107-136.

STRAMM, L.E.; LI, W.; AGUIRRE, G.D. y ROCKEY, J.H. (1987). Glycosaminoglycan synthesis and secretion by bovine retinal capillary pericytes in culture. Exp. Eye Res. 44: 17-28.

STURMAN, J.A.; GAULL, G.E. y RÄIHÄ, N.C.R. (1970a). Absence of cystathionase in human fetal livers: is cysteine essential? Science 169: 74-76.

STURMAN, J.A.; RASSIN, D.K. y GAULL, G.E. (1970b) Distribution of transsulphuration enzymes in various organs and species. Int. J. Biochem. 1: 251-253.

STURMAN, J.A.; RASSIN, D.K. y GAULL, G.E. (1978). Taurine in the development of the Central Nervous System. En: «Taurine and Neurological disorders». (A. Barbeau y R.J. Huxtable, eds). Raven Press, New York. pp: 49-71.

STURMAN, J.A.; MORETZ, R.; FRENCH, J. y WISNIEWSKI, H.M. (1985). Taurine deficiency in the developing cat: persistence of cerebellar external granule cell layer. J. Neurosci. Res. 13: 405-416.

STURMAN, J.A. (1990). Taurine deficiency. En: «Taurine: functional neurochemistry, physiology and cardiology». Wiley Liss Inc. 351: 385-395.

SU, B.; HANSON, V.; PERRY, D. y PUSZKIN, S. (1991). Neuronal specific protein NP185 is enriched in nerve endings: binding characteristics for clathrin light chains, synaptic vesicles, and synaptosomal plasma membrane. J. Neurosci. Res. 29 (4): 461-473.

SUÁREZ-NÁJERA, I.; FERNÁNDEZ-RUIZ, B. y GARCÍA-SEGURA, L.M. (1980). Specialized contacts of astrocytes with astrocytes and with other cell types in the hypothalamus of the hamster. J. Abat. 130 (1): 55-61.

SUDDITH, R.L.; SAVAGE, K.E. y EISENBERG, H.M. (1980). Ultrastructural and histochemical studies on cerebral capillary synapses. Adv. Exp. Med. Biol. 131: 139-145.

SUZAKI, K. y GROVER, W.D. (1970). Krabbe's Leucodystrophy (globoid cell leucodystrophy). An ultrastructural study.

Arch. Neurol. 22: 385-396.

SUZUKI, Y.; LEDERIS, K.; HUANG, M.; LEBLANC, F.F. y RORSTAD, O.P. (1983). Relaxation of bovine, porcine and human brain arteries by parathyroid hormone. *Lige Sci.* 33: 2494-2503.

SUZUKI, Y.; OKADA, T.; SHIBUYA, M.; KAGEYAMA, N.; ASANO, M. y HIDAKA, H. (1984). Gamma-aminobutyric acid-induced contraction of the dog basilar artery. *Pharmacology* 29: 24-30.

SWANK, R.L. y PRADOS, M. (1942). Avian thiamine defficiency. II. Pathologic changes in the brain and cranial nerves (specially vestibular) and their relation to the clinical behaviour. *Arch. Neurol. Psychiatry.* 47: 97-131.

SWANSON, L.W.; CONNELLY, M.A. y HARTMAN, B.K. (1977). Ultrastructural evidence for central monoaminergic innervation of blood vessels in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.* 136: 166-173.

SZUMANSKA, G.; PALKAMA, A.; LEHTOSALO, J.I. y UNSITALO, H. (1984). Adenylate cyclase in the microvessels of the rat brain. *Acta Neuropathol. (Berl).* 62: 219-224.

SZTRIHA, L. y JOÓ, F. (1986). Intraendothelial accumulation of calcium in hippocampus and thalamus of rats after systemic kainic acid administration. *Acta Neuropathol.* 72: 111-116.

SZTRIHA, L. (1987). Histamine  $h_2$ -receptors participate the formation of brain edema induced by kainic acid in the thalamus of rat. *Neurosci. Letters* 75: 334-338.

SZTRIHA, L. y BEZT, A.L. (1991). Oleic acid reversibly opens the blood-brain barrier. *Brain Res.* 550: 257-262.

TABER, K.H.; LIN, C.T.; LIN, J.W.; THALMANN, R.H. y WU, J.Y. (1986). Taurine in hippocampus: localization and postsynaptic action. *Brain Res.* 386: 113-121.

TAGAMI, M.; KUBOTA, A.; NARA, Y. y YAMORI, Y. (1991). Detailed disease processes of cerebral pericytes and astrocytes in stroke-prone SHR. *Clin. Exp. Hypertens. A.* 13 (5): 1069-1075.

TAI, C.Y. (1986). Calcium influxes into brain and cerebrospinal fluid are linearly related to plasma ionized calcium concentration. *Brain Res.* 385: 227-236.

TAKAGI, H. (1986). Histamine axons in the neostriatum and cerebral cortex of the rat: a correlated light and electron microscopic immunocytochemical study using histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res.* 364: 114-123.

TAKAKURA, Y.; ANDUS, K.L. y BORCHARDT, R.T. (1991). Blood-brain barrier: transport studies in isolated brain capillaries

- and cultured brain endothelial cells. Adv. Pharmacol. 22: 137-165.
- TALMAN, W.T. y ROBERTSON, S.C. (1989). Glycine, like glutamate, microinjected into the nucleus tractus solitarii of rat decreases arterial pressure and heart rate. Brain Res. 477: 7-13.
- TAO-CHENG, J.H.; NAGY, Z. y BRIGHTMAN, M.W. (1987). Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. J. Neurosci. 7: 3293-3299.
- TAO-CHENG, J.H. y BRIGHTMAN, M.W. (1988). Development of membrane interactions between brain endothelial cells and astrocytes in vitro. Int. J. Dev. Neurosci. 6: 25-37.
- TERRY, R.D. y WEISS, M. (1963). Studies in Tay-Sachs disease. II. Ultrastructure of the cerebrum. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 22: 18-55.
- TILTON, R.G. (1991). Capillary pericytes - Perspectives and future Trends. J. Electron Microscopy Technique 19 (3): 327-344.
- TIMPL, R.; RHODE, H.; ROBEY, P.G.; RENNARD, S.I.; FAIDART, J.M. y MARTIN, G.R. (1979). Laminin: a glycoprotein from basement membrane. J. Biol. Chem 254: 9933-9937.
- TIMPL, R. y DZIADEK, M. (1986). Structure, development and molecular pathology of basement membranes. Int. Rev. Exp. Pathol. 29: 1-112.
- TORACK, R.M. (1969). Ultrastructural and histochemical studies of cortical biopsies in suacute dementia. Acta Neuropathol. 13: 43-55.
- TONTSCH, U. y BAUER, H.C. (1991). Glial cells and neurons induce BBB related enzymes in cultured cerebral endothelial cells. Brain Res. 539: 247-253.
- TOTH, J. y LAJTHA, A. (1977). Rate of mexchange of free amino acids between plasma and brain in mice. Neurochem. Res. 2: 149-160.
- TREHERNE, J.E. (1981). Glial-neurone interactions. J. Exp. Biol. 95: 1.
- TUCEK, S. (1967). Observations on the subcellular distribution of choline acetyltransferase in the brain tissue of mammals and comparisons of acetylcholine synthesis from acetate and citrate in homogenates and nerve-ending fractions. J. Neurochem. 14: 519-529.
- VAN DEURS, B. (1976). Observations on the blood-brain barrier in hypertensive rats, with particular reference to phagocotic pericytes. J. Ultrastruct. Res. 56: 65-77.

- VICTORM.; ADAM, R.D. y COLLINS, G.H. (1971). The Wernicke-Korsakoff syndrome: a clinical and pathological study of 245 patients, 82 with postmortem examination. *Contemp. Neurol. Ser.* 7: 1-206.
- VILLEGAS, J.; EVANS, P.D. y REALE, V. (1988). Electrophysiology of schwan cell receptors. En: «Glial Cell Receptots», (H.K. Kimelberg, ed). Raven Press, Ltd. New York. pp: 141-157
- VIMTRUP, P. (1922). Anatomy of capillaries. *Klin. Wochenschr.* 1: 1696 (abstract).
- von MURALT, A. (1947). Thiamine and peripheral neurophysiology. En: «Vitamines and Hormones». Academic Press. New York. Vol. 5. pp: 93-118.
- VORBRODT, A.W.; SZUMANSKA, G. y DOBOGOWSKA, D.H. (1984b). Cytochemical studies of adenylate cyclase in the choroid plexus and brain vessels of rat and mouse. *J. Histochem. Cytochem.* 32: 275-284.
- VORBRODT, A.W. y TROWBRIDGE, R.S. (1991a). Ultrastructural study of transcellular transport of native and cationized albumin in cultured sheep brain microvascular endothelium. *J. Neurocytol.* 20: 998-1006.
- VORBRODT, A.W. y TROWBRIDGE, R.S. (1991b). Ultracytochemical characteristics of cultured sheep brain microvascular endothelial cells. *J. Histochem. Cytochem.* 39 (11): 1555-1563.
- WADE, J.V.; OLSON, J.P.; SAMSON, F.E.; NELSON, S.R. y PAZDERNIK, T.L. (1988). A possible role for the taurine in osmoregulation within the brain. *J. Neurochem.* 51: 740-745.
- WAGNER, H.J.; PILGRIM, C.H. (1974). Extracellular and transcellular transport of horseradish peroxidase (HRP) through the hypothalamic tanycytic ependyma. *Cell Tissue Res.* 152: 477-491.
- WAHL, M.; UNTERBERG, A.; BAETHMAN, K. y SCHILLIN, L. (1988). Mediators of blood-brain barrier dysfunction of vasogenic brain edema. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 8: 621-634.
- WALLIN, A. y BLENNOW, K. (1991) Pathogenetic basis of vascular dementia. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 5: (2): 91-102.
- WALZ, W. (1988). Physiological consequences of activating serotonin receptors. En: «Glial Cell Receptors», (H.K. Kimelberg, ed). Raven Press, Ltd. New York. pp: 121-130.
- WEBER, M.; MEHLER, R.M. y WOLLNY, E. (1987). Isolation and partial characterization of a 56.00 Dalton phosphoprotein phosphatase from the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 49: 1050-1056.

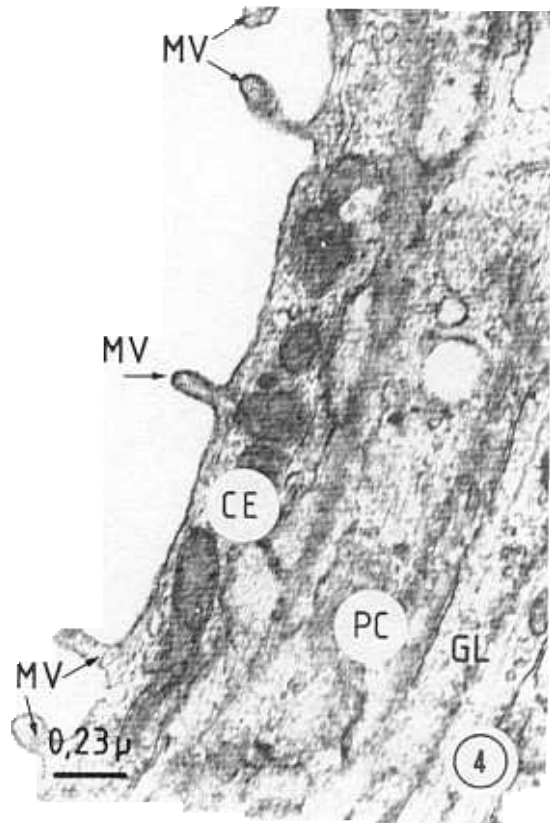
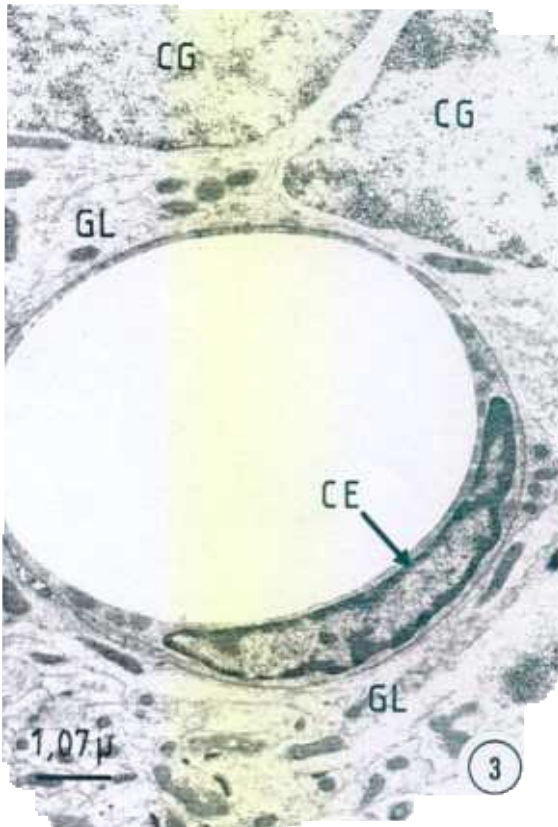
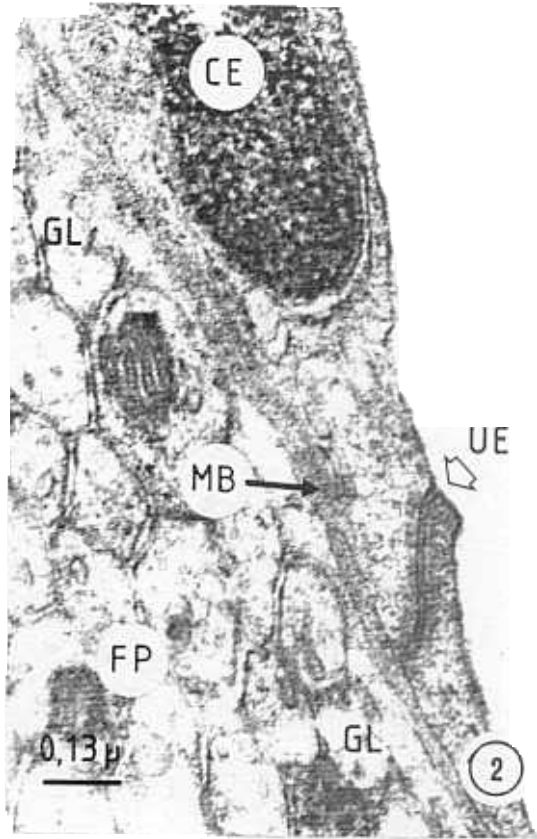
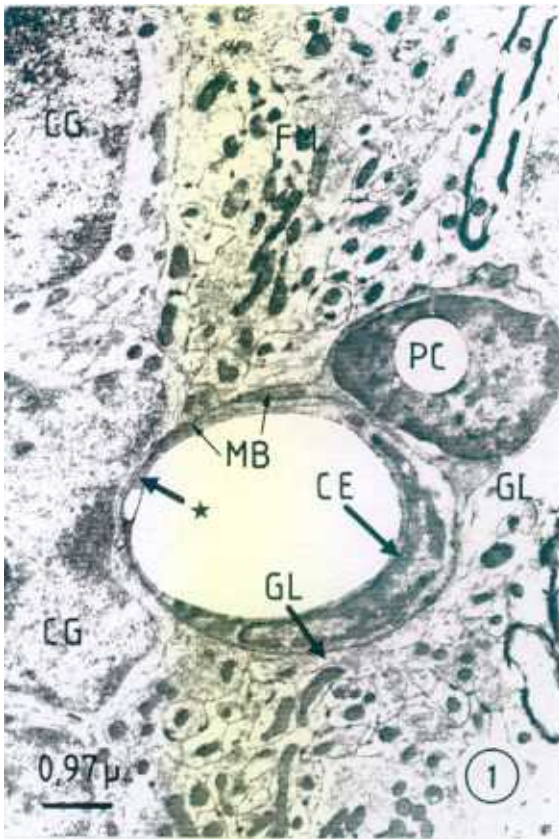


- WEI, E.P.; KONTOS, H.A. y PATTERSON, J.L. (1978). Vasoconstrictor effect of angiotensin on pial arteries. *Stroke* 9: 487-489.
- WELCH, K.M.A.; CHABI, E.; BARTOSH, K.; ACHAR, V.S. y MEYER, J.S. (1975). Cerebrospinal fluid od  $\gamma$ -aminobutyric acid levels in migraine. *Brit. Med. J.* 3: 516-517.
- WESTERGAARD, E. y BRIGHTMAN, M.W. (1973). Transport of proteins across normal cerebral arteries. *J. Comp. Neurol.* 152: 17-44.
- WESTERGAARD, N.; FOSMARK, H. y SCHOUSBOE, A. (1991). Metabolism and release of glutamate in cerebellar granule cells cocultured with astrocytes from cerebellum or cerebral cortex. *J. Neurochem* 56 (1): 59-66.
- WHITAKER-AZMITIA, P.M. (1988). Astroglial serotonin receptors. En: «Glial cell Receptors». (H.K. Kimelberg, ed). Raven Press, Ltd. New York. pp: 107-120.
- WILKIN, G.P. y CHOLEWINSKI, A. (1988). Peptide receptors on astrocytes. En: «Glial cell Receptors». (H.K. Kimelberg, ed). Raven Press, Ltd. New York. pp: 223-241.
- WILMERS, F. y HOSSMANN, K.A. (1979). A spacific immunofluorescence technique for the demonstration of vasogenic brain edema in paraffin embedded materiel. *Acta Neuropathol.* (Berl). 45: 47-51.
- WINIEWSKI, H.M.; COBLENTS, J.M. y TERRY, R.D. (1972). Pick's disease: a clinical and ultrastructural study. *Arch. Neurol.* 26: 97-108.
- WINIEWSKI, H.M. y KOZLOWSKI, P.B. (1982). Evidence of blood-brain barrier changes in senile dementia of the Alzheimer's type. *Ann. NY. Acad. Sci.* 396: 119-129.
- WINN, H.R.; RUBIO, G.R. y BERNE, R.M. (1981). The role of adenosine in the regulation of cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1: 239-244.
- WISLOCKI, G.B. y KING, L.S. (1936). The permeability of the hypophysis and hypothalamus to vital dyes, with a study of the hypophyseal vascular supply. *Am. J. Anat.* 58: 421-472.
- WOLMAN, M.; KLATZO, I.; CHUI, E.; WILMERS, F.; NISHIMOTO, K.; FUJIWARA, K. y SPATZ, M. (1981). Evaluation of the dye-protein tracers in pathophysiology of the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol.* (Berl). 54: 55-61.
- WRIGHT, J. (1986). Immunocytochemistry, modern methods and applications. 2<sup>nd</sup> ed. (J.M. Polak y S. Van Noorden, eds).
- WRIGHT, C.E.; TALLAN, H.H.; LIN, Y.Y. y GAULL, G.E. (1986). taurine: biological update. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 427-453.

- WU, J.Y.; LIAO, C.C.; LIN, C.J.; LEE, Y.H.; HO, J.Y. y TSAI, W.H. (1990). Taurine receptor in the mammalian brain. En: «Taurine: functional neurochemistry, physiology and cardiology». Wiley Liss, Inc. 351: 147-156.
- WURDIG, S. y KUGLER, P. (1991). Histochemistry of glutamate metabolizing enzymes in the rat cerebellar cortex. *Neurosci. Lett.* 130 (2): 165-168.
- XU, R.X.; YI, S.Y. y WANG, B.Y. (1991). Experimental evaluation of blood-brain barrier permeability using colloidal gold particles as tracers in early-stage brain injury. *Chin. Med. J. Engl.* 104 (8): 634-638.
- YAKSH, T.L.; WANG, J.Y.; GO, V.L.W. y HARTY, G.J. (1987). Cortical vasodilation produced by vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and by physiological stimuli in the cat. *J. Cereb. Blood flow Metab.* 7: 315-326.
- YARBROUGH, G.G.; SLIP, K. y TAYLOR, D. (1981). Neuropharmacological characterization of a taurine antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 21: 604.
- YARBROUGH, G.G.; SINGH, D.T. y TAYLOR, D.A. (1981). Neuropharmacological characterization of a taurine antagonist. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 219: 604-613.
- YAZULLA, S. y STUDHOLME, K.M. (1991). Glycine-receptor immunoreactivity in retinal bipolar cells is postsynaptic to glycinergic and GABAergic amacrine cells synapses. *J. Comp. Neurol.* 310 (1): 11-20.
- YOSHIMI, K.; TAKEDA, M.; NISHIMURA, T.; KUDO, T.; NAKAMURA, Y.; TADA, K y IWATA, N. (1991). An immunohistochemical study of MAP2 and clathrin in gerbil hippocampus after cerebral ischemia. *Brain Res.* 560 (1-2): 149-158.
- YOSHIMINE, T.; MORIMOTO, K.; HOMBURGER, H.A. y YNAGIHARA, T. (1984). Immunohistochemical localization of creatin-kinase BB isoenzyme in human brain: comparison with tubulin and astro-protein. *Braun Res.* 265: 101-108.
- YOUNG, A.B.; OSTER-GRANITE, M.L.; HERNDON, R. y SNYDER, S.H. (1974). Glutamic acid: selective depletion by viral induced granule cell loss in hamster cerebellum. *Brain Res.* 73: 1-2.
- YOUNG, A.R.; HAMEL, E. y MACKENZIE, E.T. (1986). Recent studies on the serotonergic innervation of the cerebral circulation: a review. En: «Neural regulation of brain circulation». (C. Owman, J.E. Hardebo, eds). Elsevier, Amsterdam, pp: 195-217.
- ZIMMERMANN, K.W. (1923). Der Feinere Bau der blut kapillaren. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* 68: 29-109.

**VIII.- FIGURAS.**

- Fig. 1.-** Sección fina de la corteza cerebelosa de la rata. La microfotografía muestra la célula endotelial [CE] y el pericito [PC] rodeados ambos por la membrana basal [MB] y las prolongaciones gliales que rodean el capilar [GL]. Nótese la presencia de una célula grano [CG] en contacto con la pared vascular [★]. [FM = Fibra Musgosa].
- Fig. 2.-** Microfotografía que muestra la unión estrecha [UE] entre las células endoteliales [CE] de los capilares cerebelosos. [GL = Glía, MB = Membrana Basal, FP = Fibras Paralelas]
- Fig. 3.-** Célula endotelial [CE] de la corteza cerebelosa en la capa granular de la laminilla. El núcleo aparece alargado y la cromatina condensada bajo el envoltorio nuclear. [GL = Glía, CG = Célula Grano].
- Fig. 4.-** Detalle ultraestructural de las numerosas microvellosidades [MV] presentes en la porción luminal de la célula endotelial [CE] haciendo protusión en la luz del capilar. [PC = Pericito, GL = Glía].



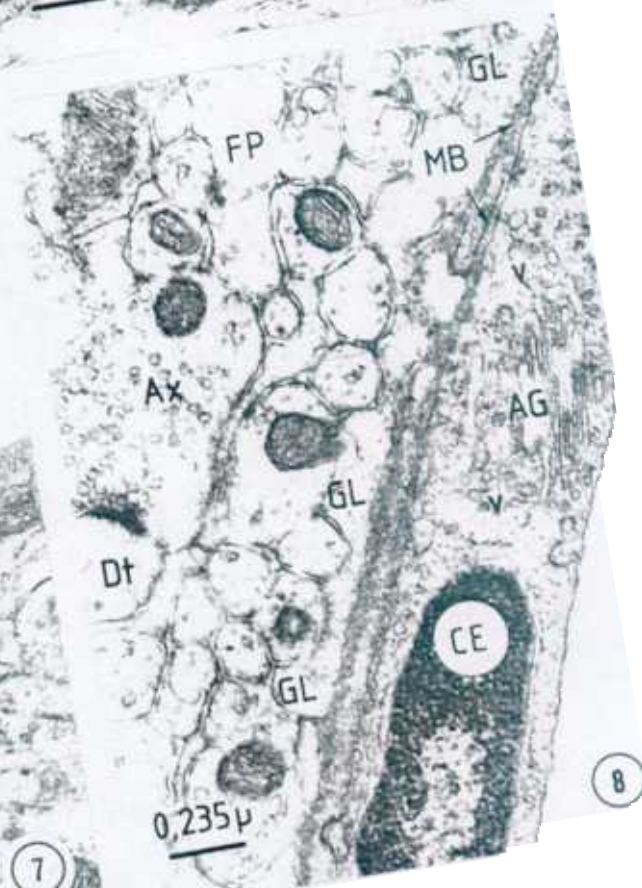
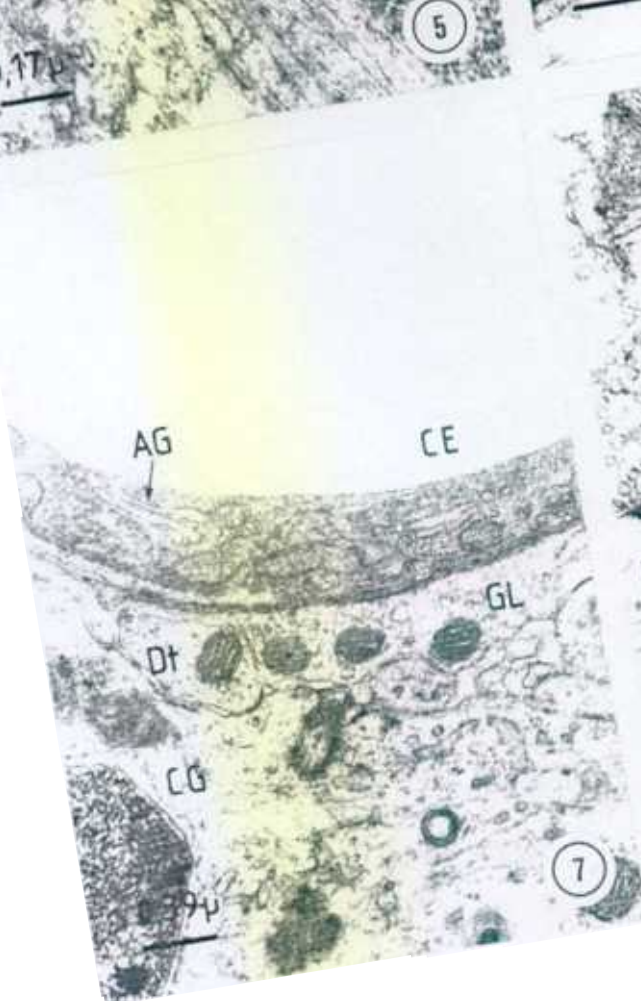
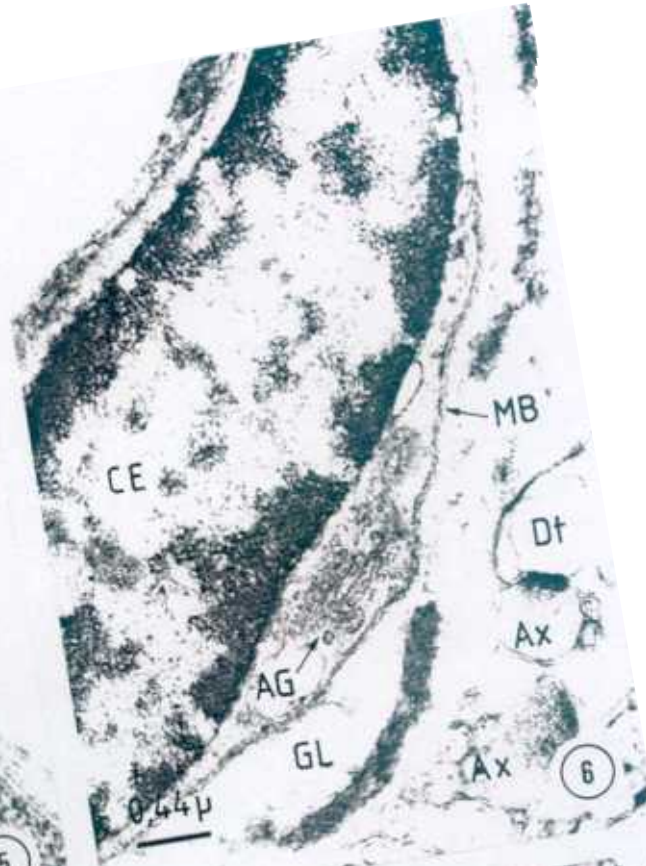
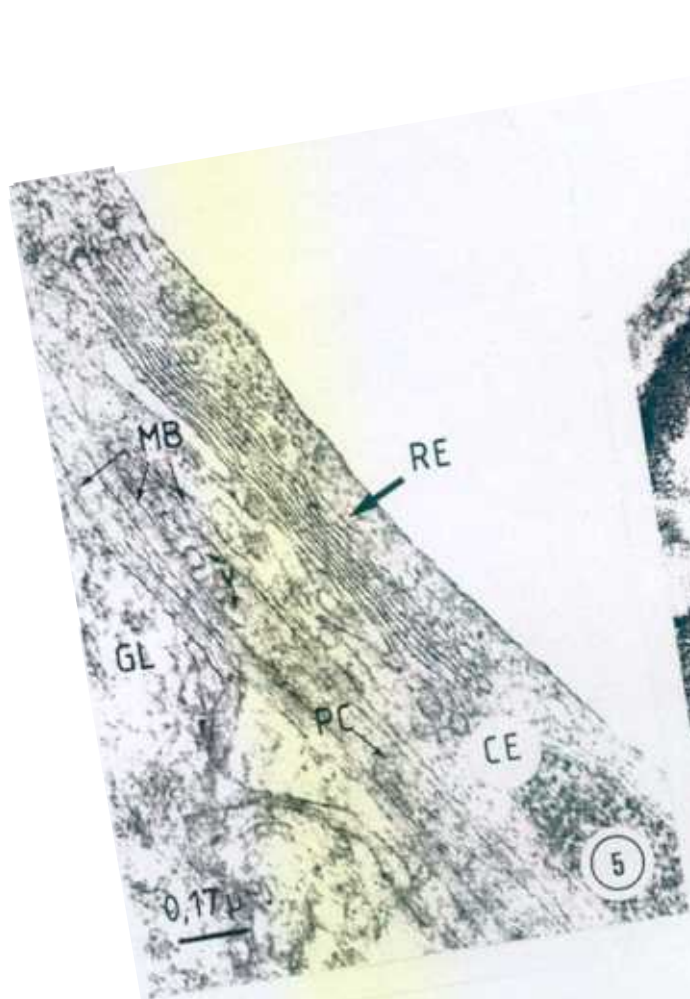
**Fig. 5.-** Aspecto ultraestructural del desarrollado retículo endoplásmico [RE] presente en la célula endotelial [CE] del capilar cerebeloso. Aparece en forma de largas cisternas planas dispuestas de forma paralela a la pared capilar. [GL = Glía, PC = Pericito, v = vesículas, MB = Membrana basal].

**Fig. 6.-** Detalle de complejo de Golgi [AG] en la célula endotelial [CE] cerebelosa. El sistema endomembranoso aparece en porción perinuclear. [GL = Glía, MB = Membrana basal, Ax = Axón, Dt = Dendrita].

**Fig. 7.-** Dictiosomas, vacuolas y vesículas del aparato de Golgi [AG] presente en la célula endotelial [CE] cerebelosa. [GL = Glía, Dt = Dendrita, CG = Célula Grano].

**Fig. 8.-** Célula endotelial [CE] con gran desarrollo del Aparato de Golgi [AG]. Nótese la abundancia de vesículas [v]. [MB = Membrana basal, GL = Glía, Ax = Axón, Dt = Dendrita, FP = Fibras paralelas].





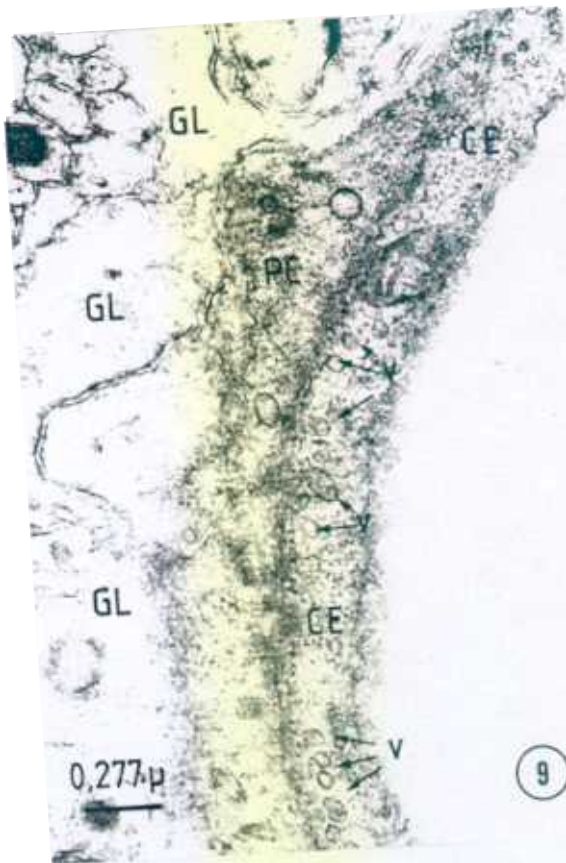
**Fig. 9.-** Abundante desarrollo de las vesículas membranosas [v] presentes en la célula endotelial [CE] y pericito [PC]. [GL = Glía].

**Fig. 10.-** Microfotografía que muestra las abundantes estructuras vesiculares [v] presentes en la célula endotelial [CE] de un capilar presente en la capa molecular de la corteza cerebelosa. [MB = Membrana basal, GL = Glía, FP = Fibras paralelas, CC = Célula Cesto].

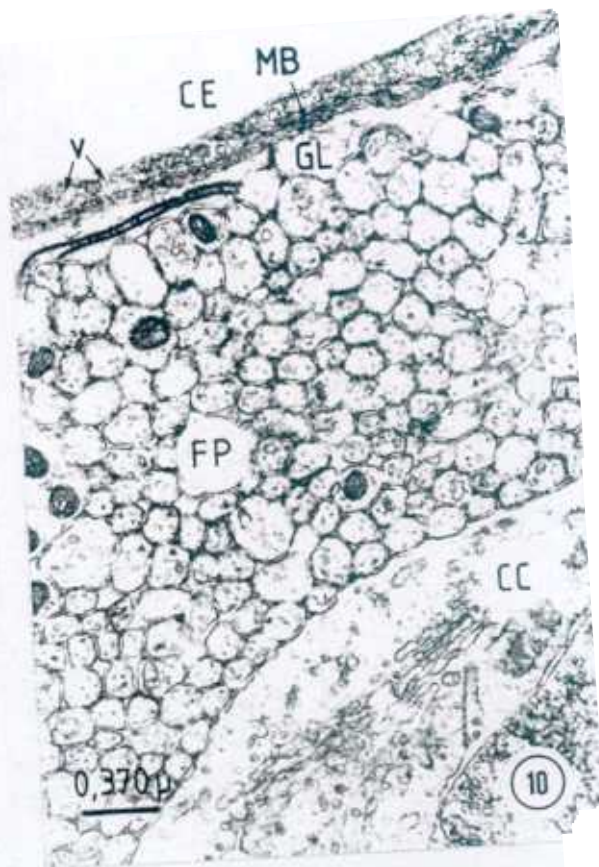
**Fig. 11.-** Detalle ultraestructural de una vesícula densa a los electrones [v] en la célula endotelial [CE]. [MB = Membrana basal, GL = Glía, FP = Fibras paralelas].

**Fig. 12.-** Estructura vesicular [v] de pinocitosis asociada a la porción luminal de la célula endotelial [CE]. [MB = Membrana basal, GL = Glía, PC = Pericito].

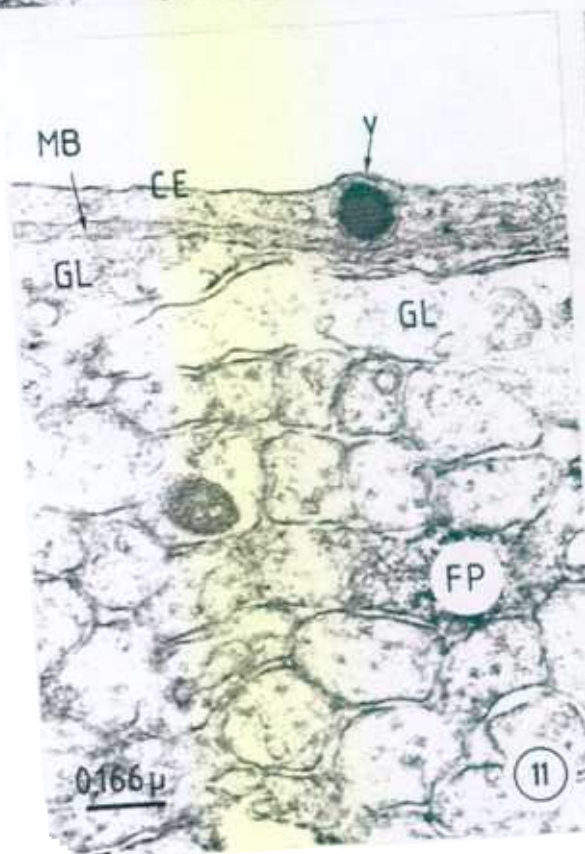




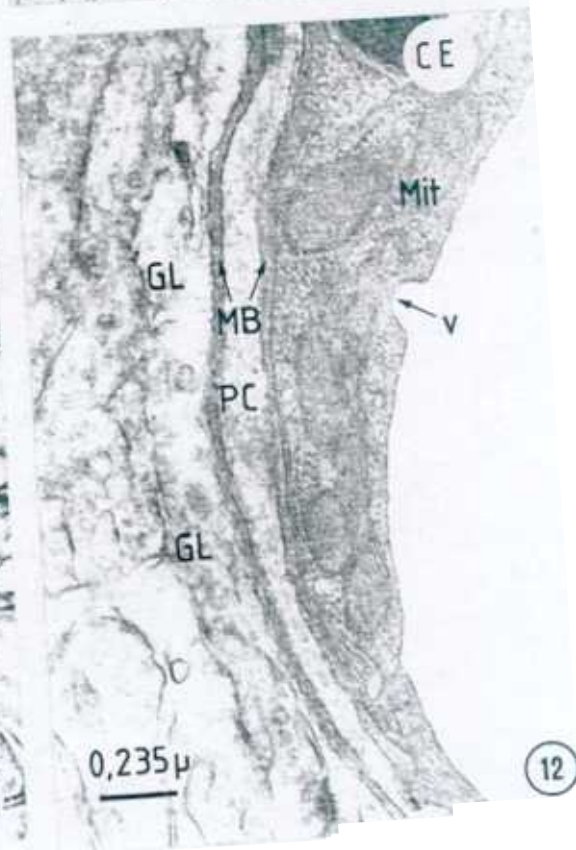
9



10



11



12

Fig. 13.- Microfotografía electrónica que muestra la presencia de numerosas vesículas de pinocitosis en las porciones luminal y abluminal de las células endoteliales [CE] y formaciones vesiculares [Fv] en el pericito [PC]. Las flechas señalan la presencia de uniones de tipo «gap» entre la célula endotelial y el pericito. [MB = Membrana basal, GL = Glía, Ax = Axón].

Fig. 14.- Detalle ultraestructural de un cuerpo multivesicular [CMv] en la célula endotelial [CE]. [MB = Membrana basal, GL = Glía, CG = Célula Grano].

Fig. 15.- Sección fina de la corteza cerebelosa en la que se observa un pericito [PC] abrazando a dos capilares sanguíneos. [CE = Célula endotelial, UE = Unión Estrecha, GL = Glía, CG = Célula Grano].

Fig. 16.- Detalle del citoplasma del Pericito [PC] Nótese la presencia de vesículas de pinocitosis [v] y aparato de Golgi [AG] de moderado desarrollo. [CE = Célula endotelial, GL = Glía, Ax = Axón].

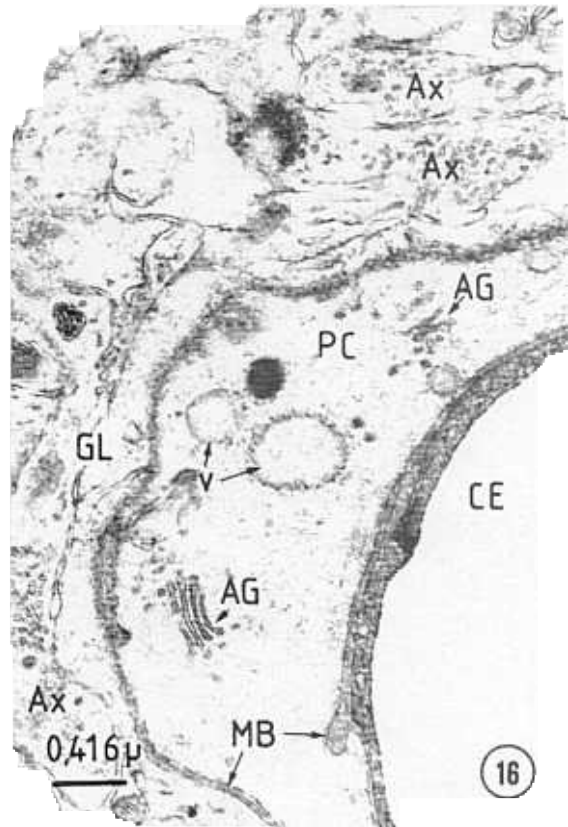
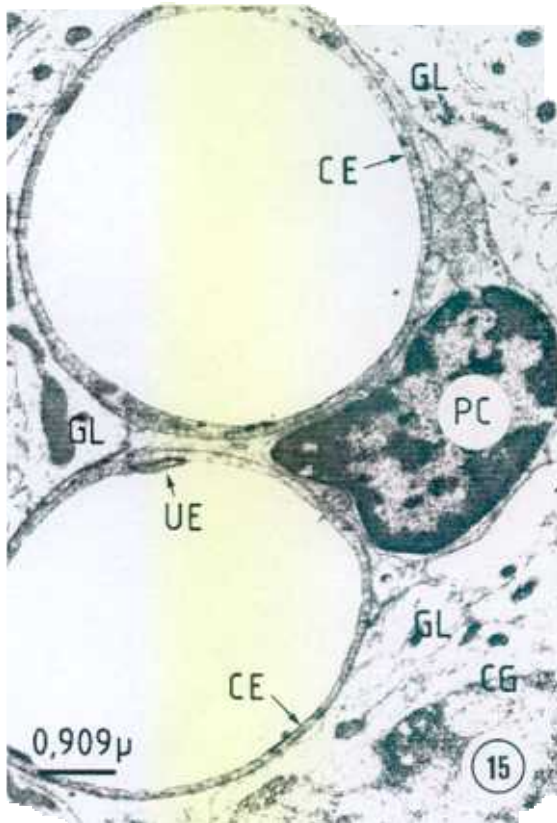
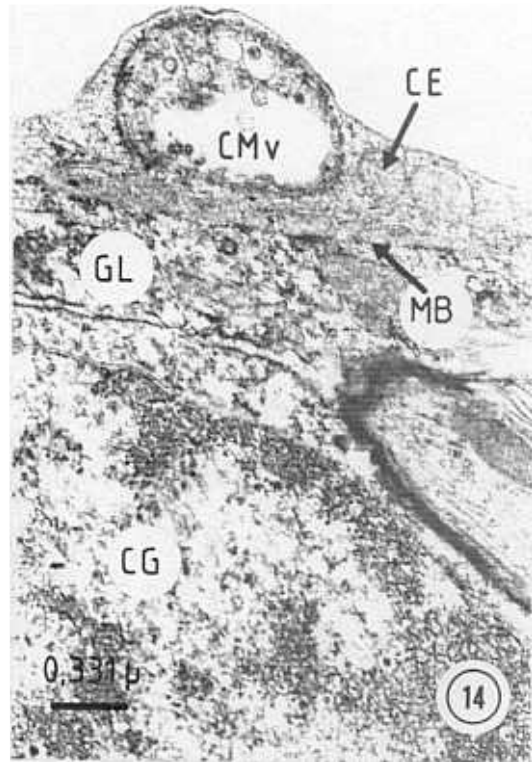
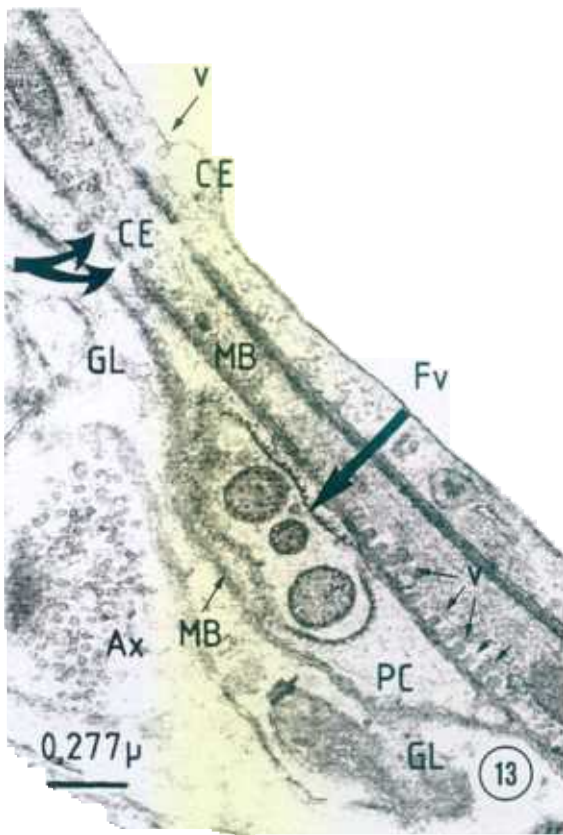


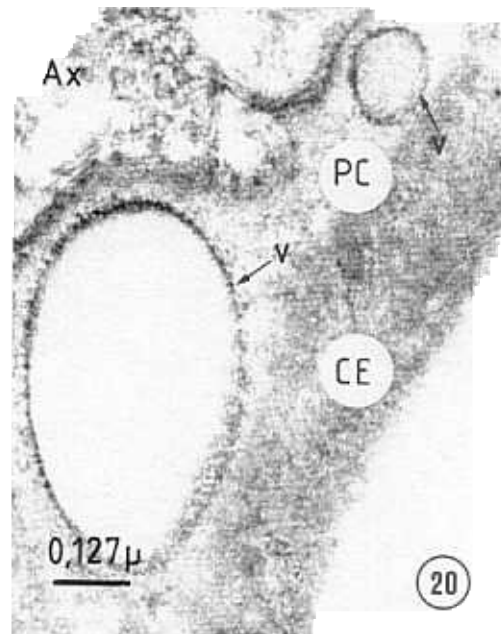
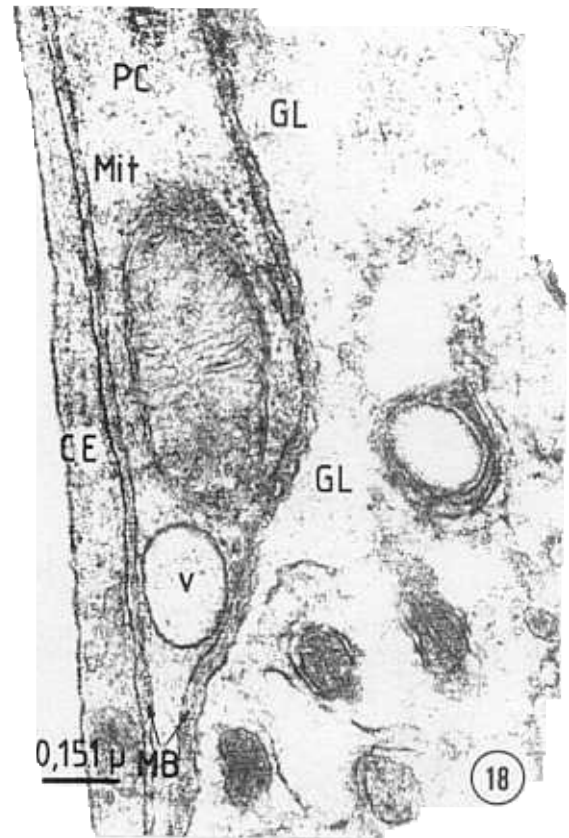
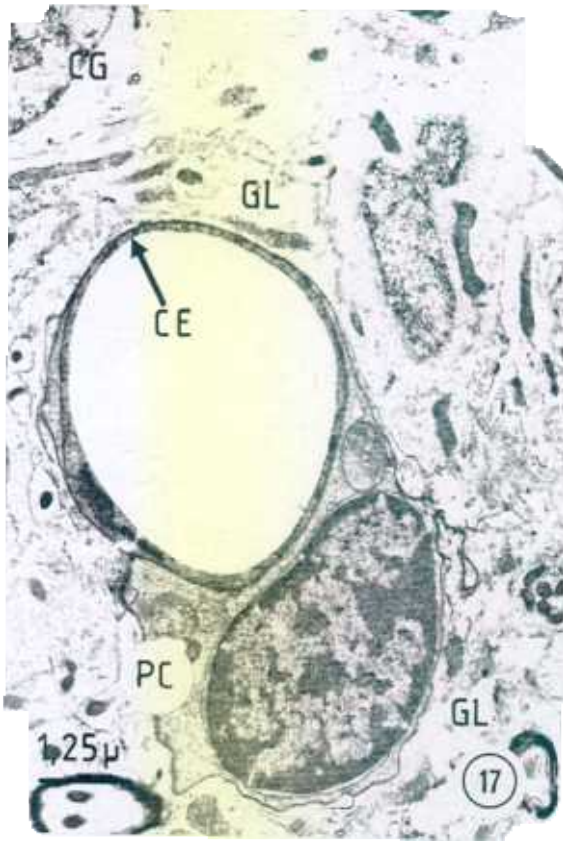


Fig. 17.- Imagen de un pericito [PC] rodeando a la célula endotelial [CE]. El núcleo aparece generalmente de forma esférica o ligeramente ovalado. Nótese la presencia de numerosas mitocondrias. [Gl = Glía, CG = Célula Grano].

Fig. 18.- Detalle ultraestructural de mitocondrias y vesículas de pinocitosis en el citoplasma de un pericito [PC]. [CE = Célula endotelial, MB = Membrana Basal, GL = Glía].

Fig. 19.- Microfotografía que demuestra la presencia de abundantes estructuras vesiculares [v] en el pericito [PC]. [CE = Célula endotelial, GL = Glía].

Fig. 20.- Detalle ultraestructural de las vesículas de pinocitosis [v] presentes en el pericito [PC]. [CE = Célula endotelial, Ax = Axón].

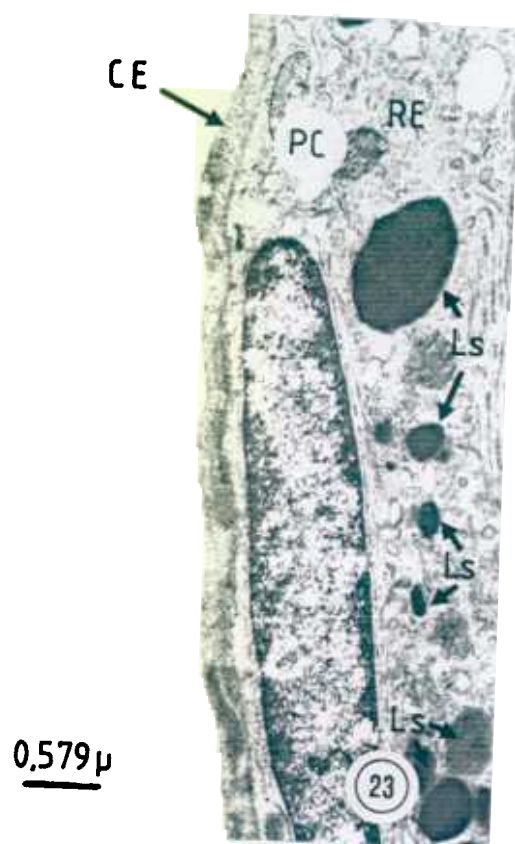
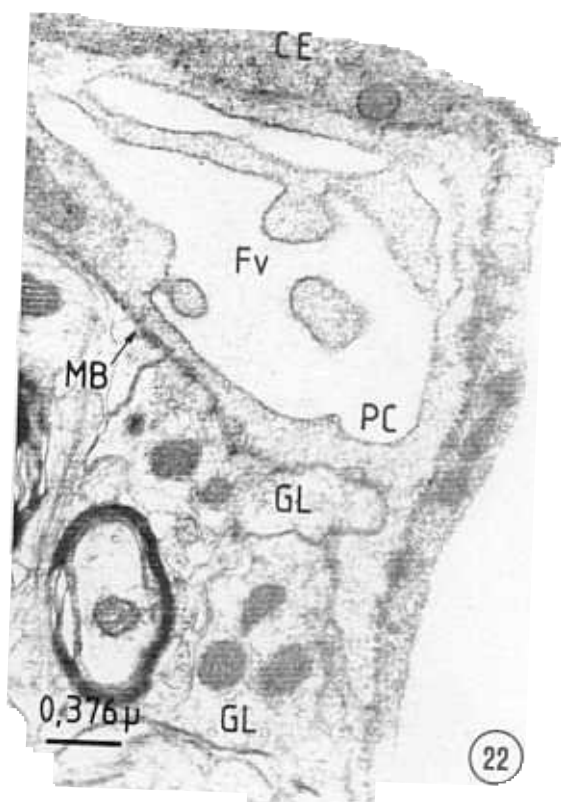
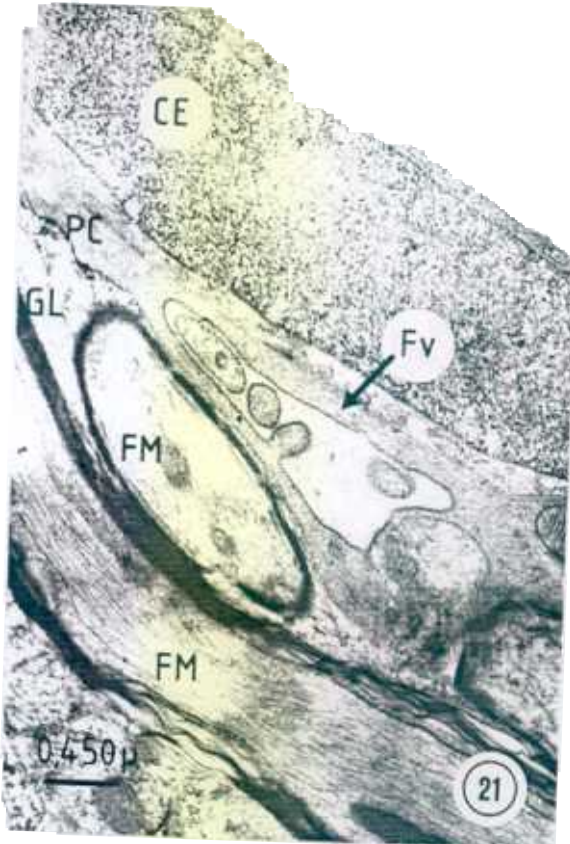


**Fig. 21.-** Fotografía a microscopía electrónica que muestra la presencia de formaciones vesiculares [[Fv]] de morfología irregular en el pericito [[PC]]. [[CE = Célula endotelial, GL = Glía, FM = Fibras mielínicas]].

**Fig. 22.-** Detalle de formaciones de tipo vesicular [[Fv]] de morfología irregular en el pericito [[PC]]. [[CE = Célula endotelial, GL = Glía, MB = Membrana Basal]].

**Fig. 23.-** Microfotografía que pone de manifiesto la presencia en el pericito [[PC]] de numerosas estructuras lisosomales [[Ls]]. Nótese el amplio desarrollo del retículo endoplásmico [[RE]]. [[CE = Célula endotelial]].

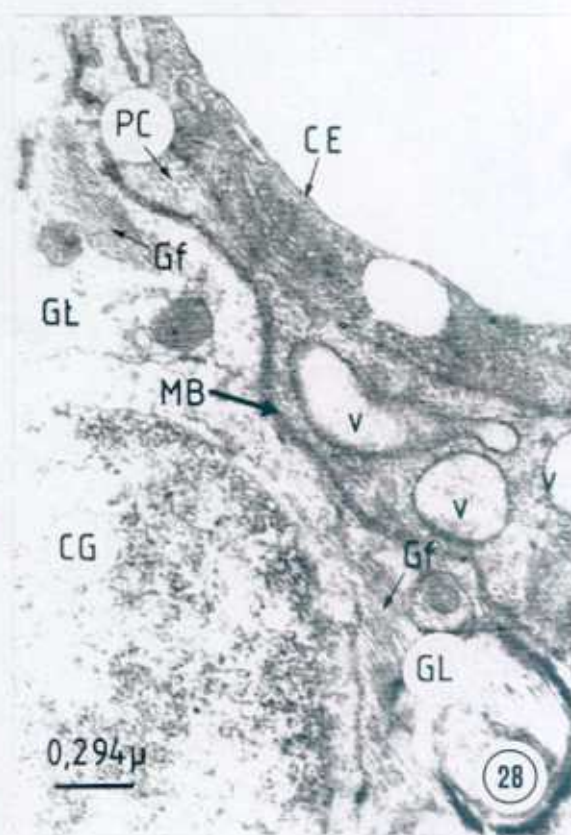
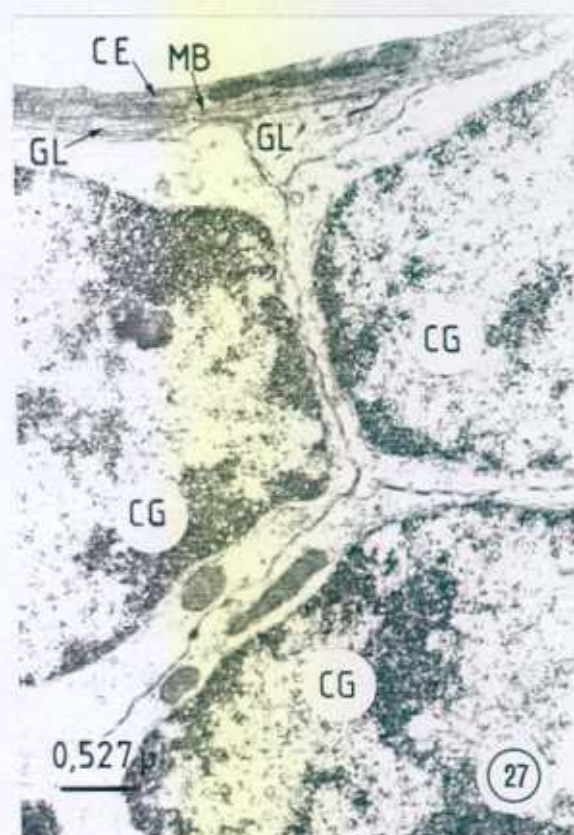
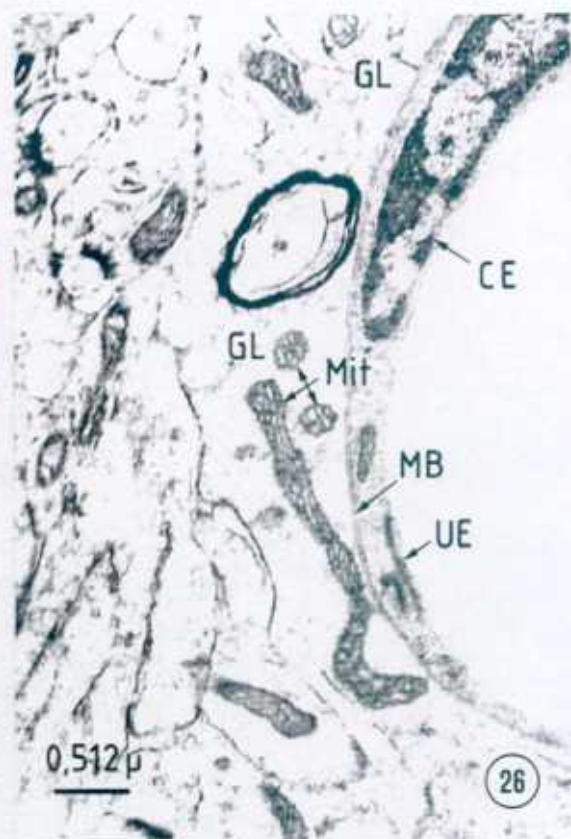
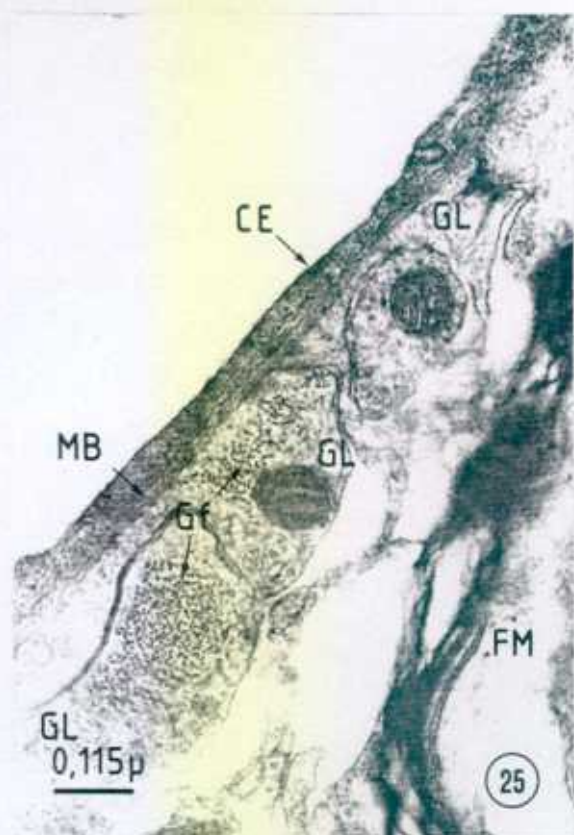
**Fig. 24.-** Imagen a microscopía electrónica de un astrocito perivascular [[GL]] rodeando a los componentes vasculares cerebelosos [[CE = Célula endotelial]]. Nótese el aspecto poco denso a los electrones del citoplasma glial y la presencia de abundantes mitocondrias y complejo de Golgi [[AG]].





- Fig. 25.- Microfotografía que muestra los haces de gliofilamentos [Gf] en sección transversal de la glía [GL] que se halla rodeando a la célula endotelial [CE]. [MB = Membrana Basal, FM = Fibra mielinica].
- Fig. 26.- Detalle ultraestructural de las mitocondrias [Mit] alargadas presentes en las prolongaciones gliales [GL] que alcanzan a los capilares cerebelosos. [CE = Célula Endotelial, MB = Membrana Basal, UE = Unión estrecha].
- Fig. 27.- Imagen ultraestructural que revela la presencia de células grano [CG] relacionadas con los capilares cerebelosos, y separadas de estos por la presencia de un envoltorio glial [GL] perivascular. [CE = Célula Endotelial, MB = Membrana basal].
- Fig. 28.- Porción de una célula Grano [CG] asociada estrechamente a la membrana basal [MB] que rodea al pericito [PC]. [CE = Célula endotelial, GL = Glía, Gf = Gliofilamentos, MB = Membrana basal].





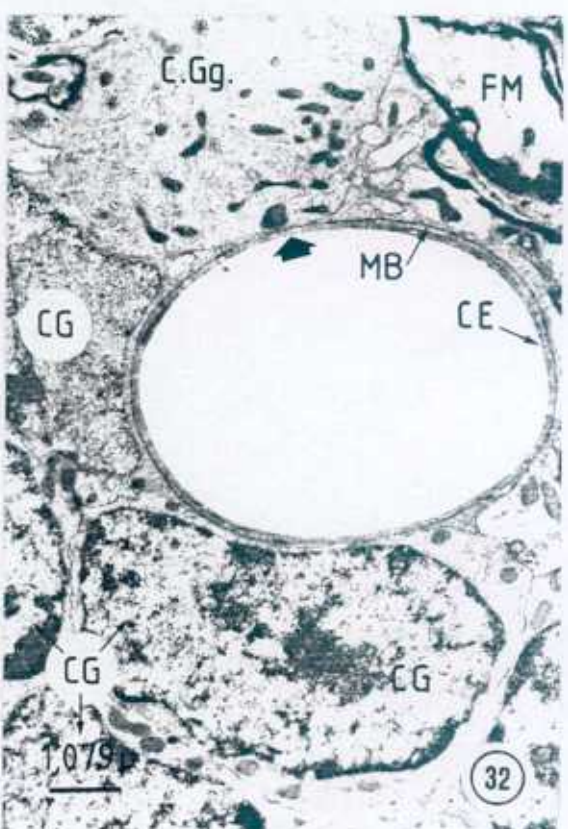
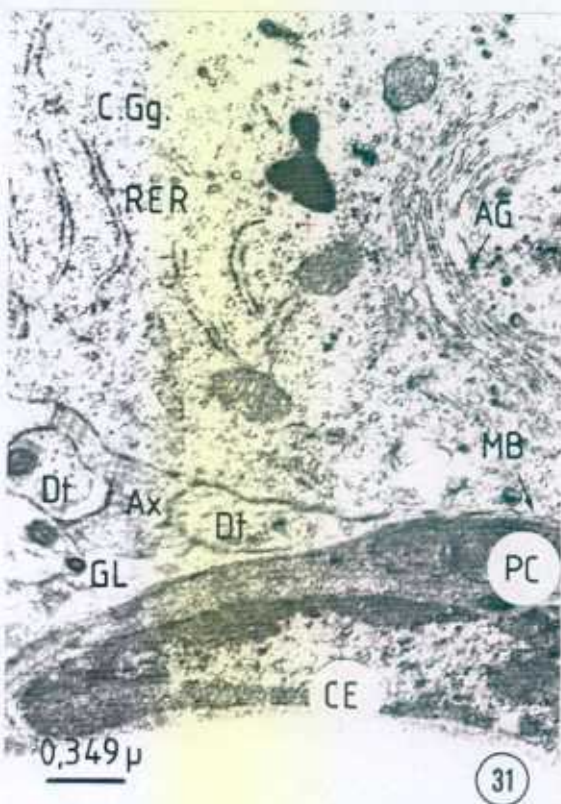
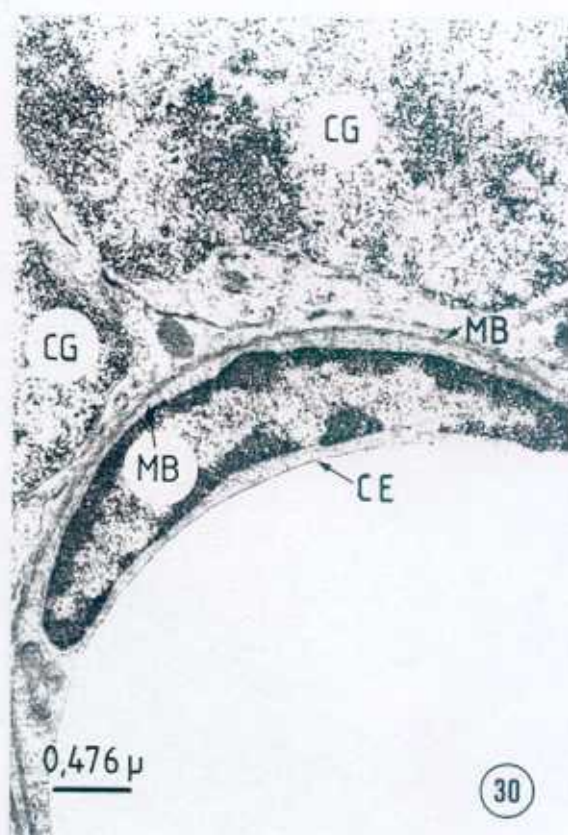
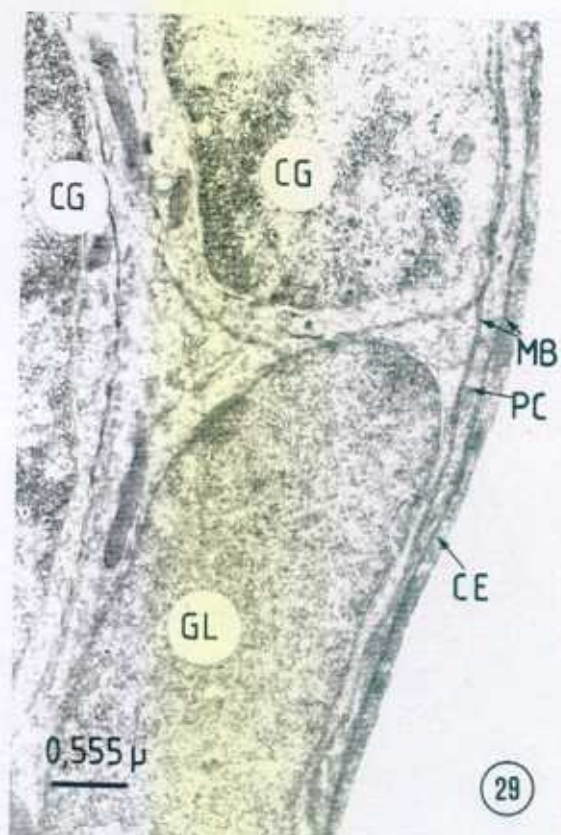
**Fig. 29.-** Fotografía a microscopía electrónica que pone de manifiesto la existencia de células grano [[CG]] asociadas íntimamente a la pared de los capilares cerebelosos. [[CE = Célula Endotelial, PC = Pericito, MB = Membrana Basal, GL = Glía]].

**Fig. 30.-** Sección fina que demuestra la relación anatómica estrecha entre las células grano [[CG]] y la membrana basal [[MB]] que rodea a la célula endotelial [[CE]].

**Fig. 31.-** Microfotografía que revela la existencia del citoplasma de una célula Golgi [[C.Gg]] en la capa granular de la corteza cerebelosa asociado de forma íntima con la membrana basal [[MB]] que rodea al pericito [[PC]]. [[CE = Célula Endotelial, GL = Glía, Ax = Axón, Dt = Dendrita]].

**Fig. 32.-** Citoplasmas de una Célula de Golgi [[CGg]] y de células grano [[CG]] en estrecho contacto con la membrana basal [[MB]] que rodea a la célula endotelial [[CE]]. [[FM = Fibra Mielínica]].





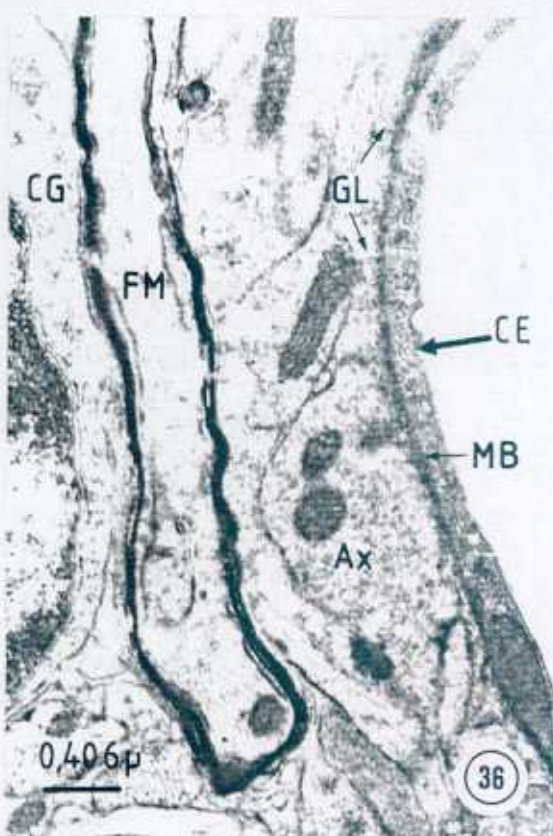
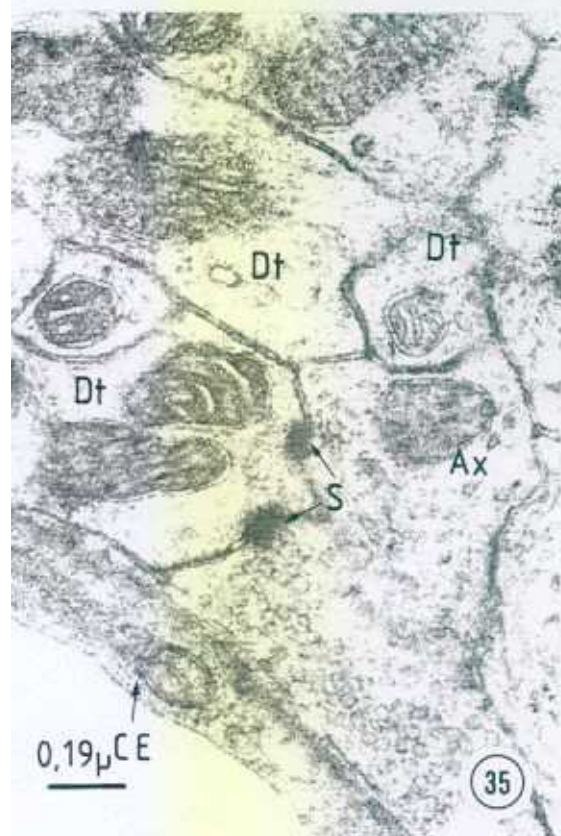
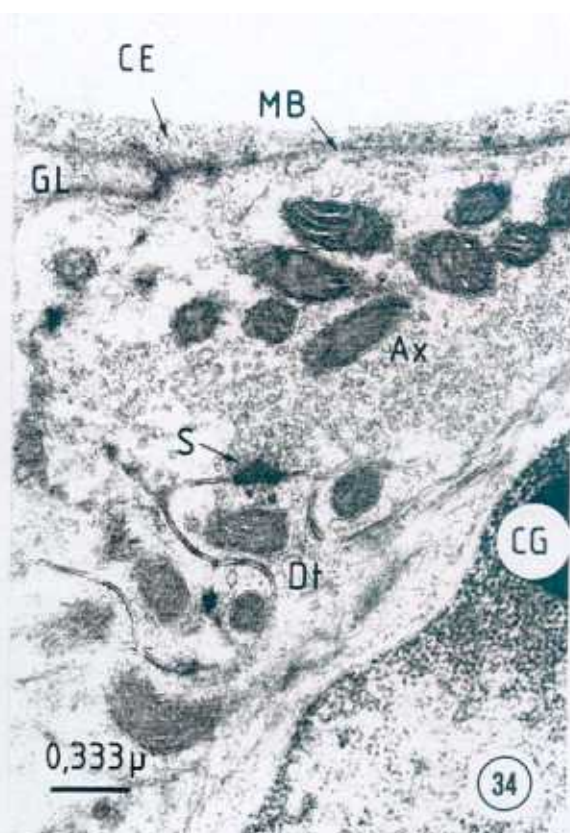
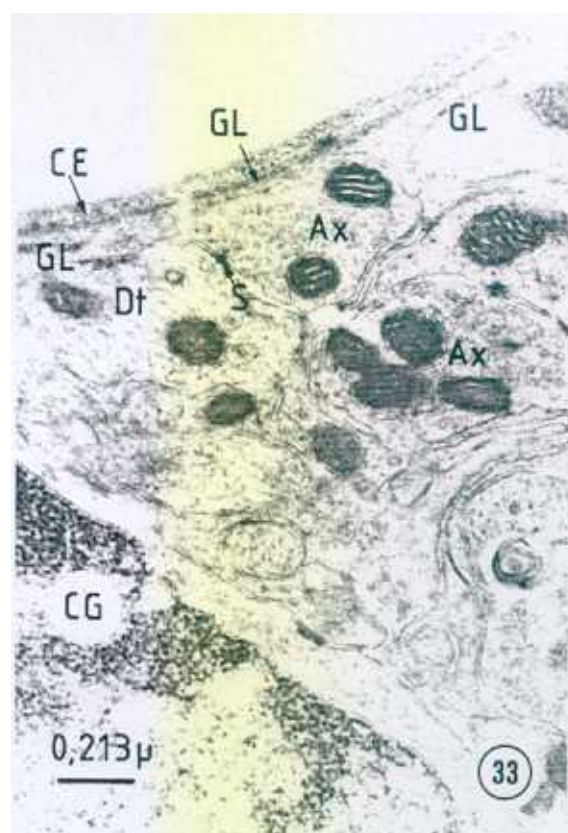
**Fig. 33.-** Sección fina de la corteza cerebelosa a nivel de la capa granular. Obsérvense la existencia de terminaciones axónicas [[Ax]] y citoplasmas dendríticos [[Dt]] en el entorno del capilar, separados de la célula endotelial [[CE]] por una delgada lámina de glía perivascular [[GL]]. [[CG = Célula Grano]].

**Fig. 34.-** Microfotografía de la capa granular de la corteza cerebelosa en la que se demuestra la estrecha relación anatómica entre terminaciones axónicas [[Ax]] y la membrana basal [[MB]] que rodea a la célula endotelial [[CE]]. [[GL = Glía, Dt = Dendrita, S = Sinapsis, CG = Célula Grano]].

**Fig. 35.-** Terminación axónica [[Ax]] y dendrita [[Dt]] en estrecho contacto con la membrana basal que rodea a la célula endotelial [[CE]] en un capilar presente en la capa granular de la corteza cerebelosa. [[S = Contacto sináptico]].

**Fig. 36.-** Microfotografía que demuestra la presencia, en la capa granular de la corteza cerebelosa, de una terminación axónica [[Ax]] en contacto íntimo con la membrana basal [[MB]] que rodea a la célula endotelial [[CE]]. [[GL = Glía, FM = Fibra Mielínica, CG = Célula Grano]].





- Fig. 37.-** Sección fina de la corteza cerebelosa, a nivel de la capa granular, en la que se muestra una fibra musgosa [FM] en el entorno del capilar sanguíneo pero separado de la membrana basal [MB] que rodea a la célula endotelial [CE], por una delgada lámina de glía perivascular [GL]. [S = Contacto sináptico].
- Fig. 38.-** Glía perivascular [GL] interpuesta entre la fibra musgosa [FM] y la membrana basal que rodea a la célula endotelial [CE].
- Fig. 39.-** Fibra musgosa [FM] de la capa granular de la corteza cerebelosa en estrecha asociación con la membrana basal que rodea a la célula endotelial [CE]. [Dt = Dendrita].
- Fig. 40.-** Microfotografía de una Fibra Musgosa [FM] en estrecho contacto con la membrana basal [MB] que rodea al pericito [PC]. [CE = Célula Endotelial, GL = Glía].



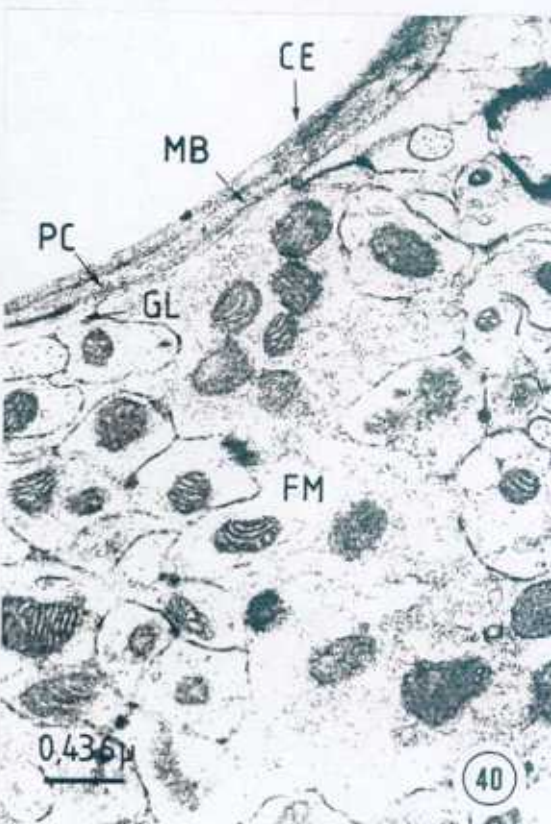
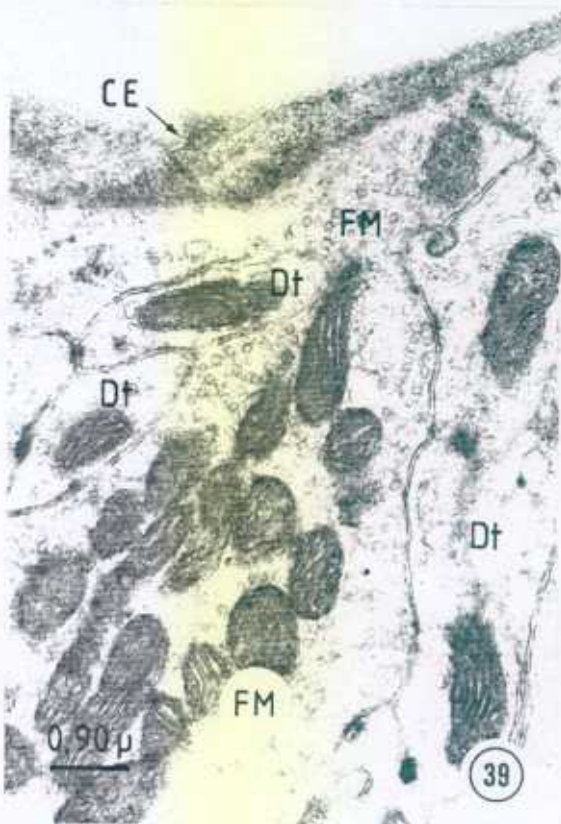
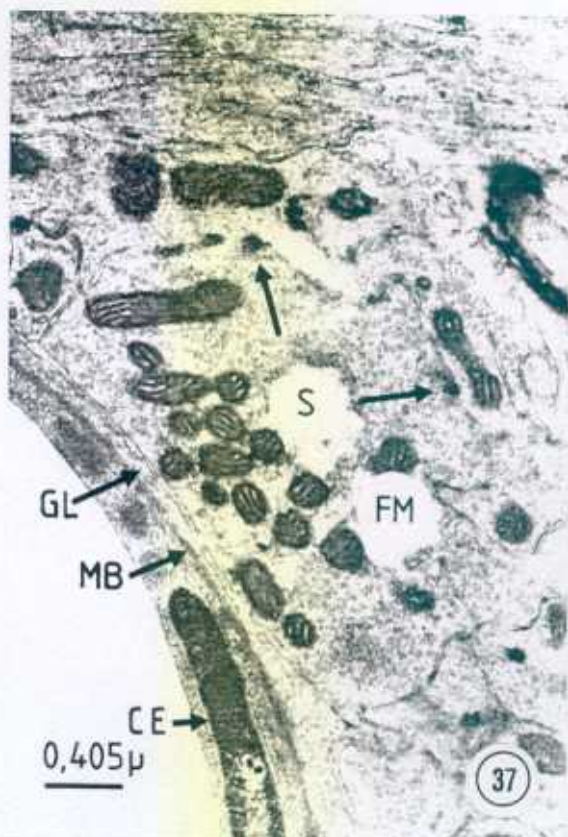
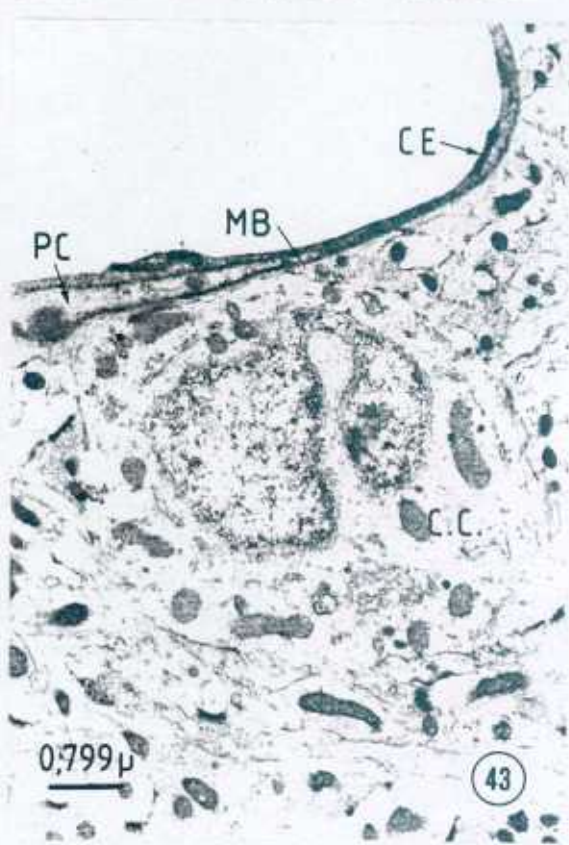
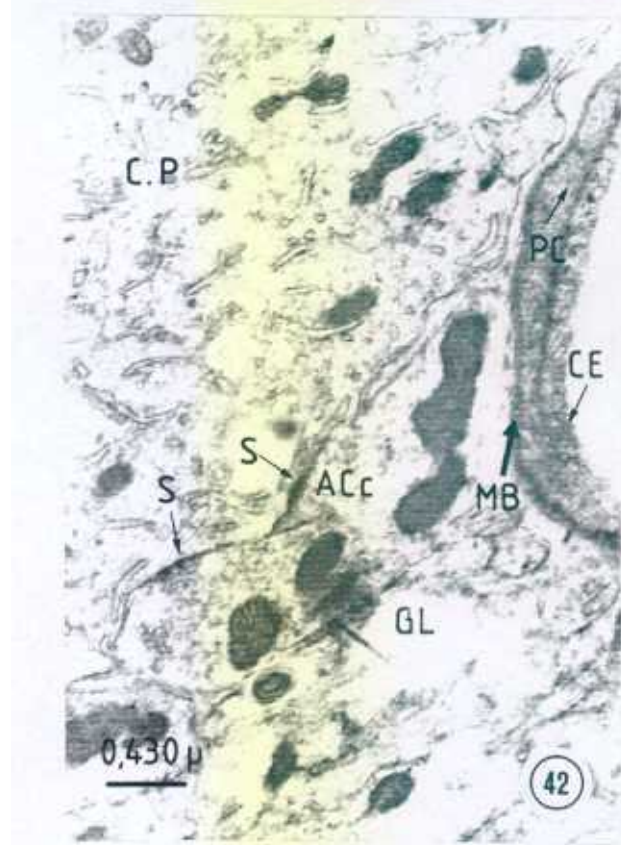
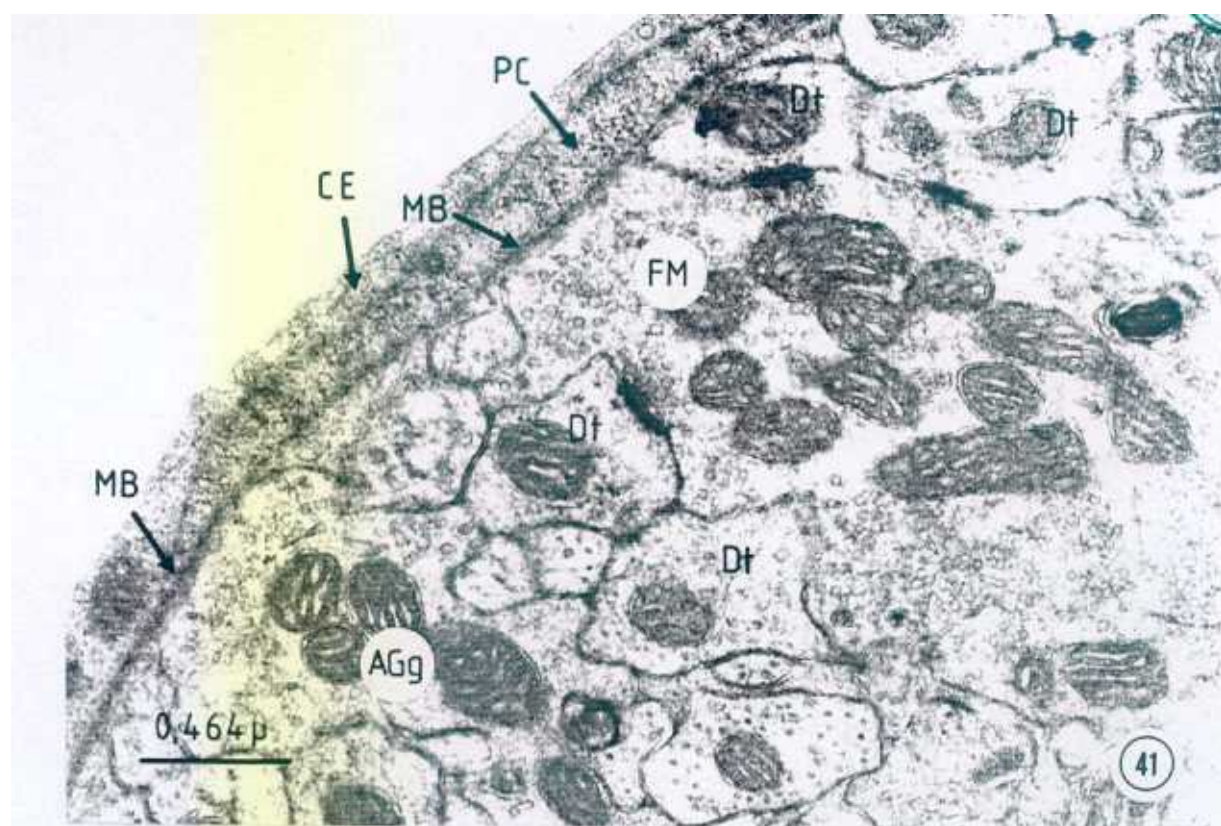


Fig. 41.- Fibra Musgosa [FM] y Axón de célula de Golgi [AGg] en estrecho contacto con la membrana basal [MB] que rodea a la célula endotelial [CE] y al pericito [PC]. [Dt = Dendrita].

Fig. 42.- Axón de célula Cesto [ACc] haciendo sinapsis con el citoplasma de una célula de Purkinje [CP] y manteniendo al mismo tiempo un estrecho contacto con la membrana basal [MB] que rodea a la célula endotelial [CE] y al pericito [PC]. [GL = Glía, S = Contacto sináptico].

Fig. 43.- Célula Cesto [CC] en estrecha asociación con la membrana basal [MB] que rodea a la pared vascular en la capa molecular de la corteza cerebelosa. [CE = Célula endotelial, PC = Pericito].





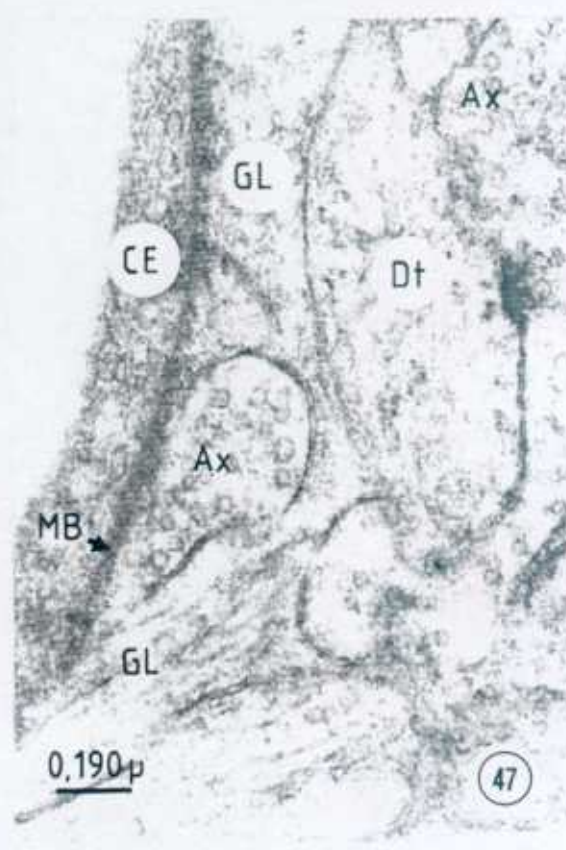
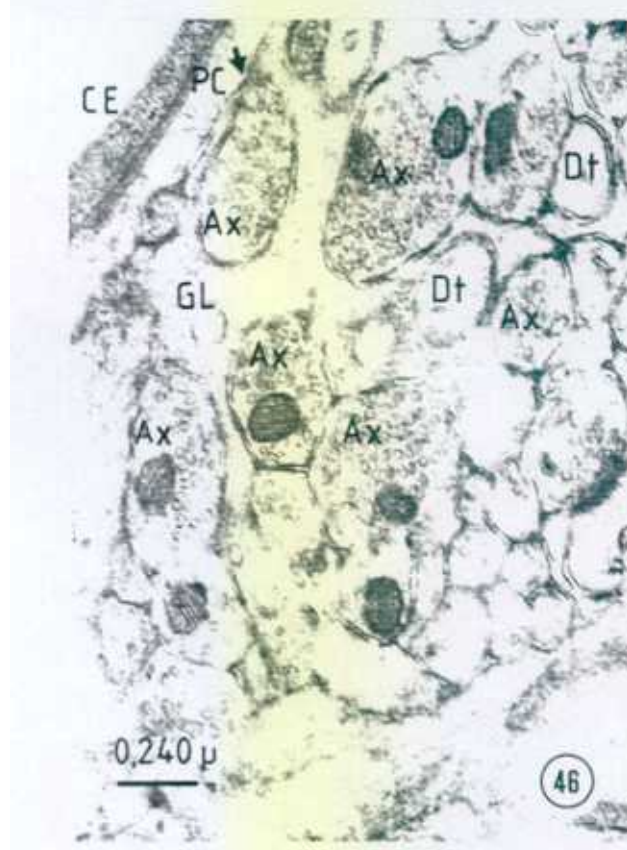
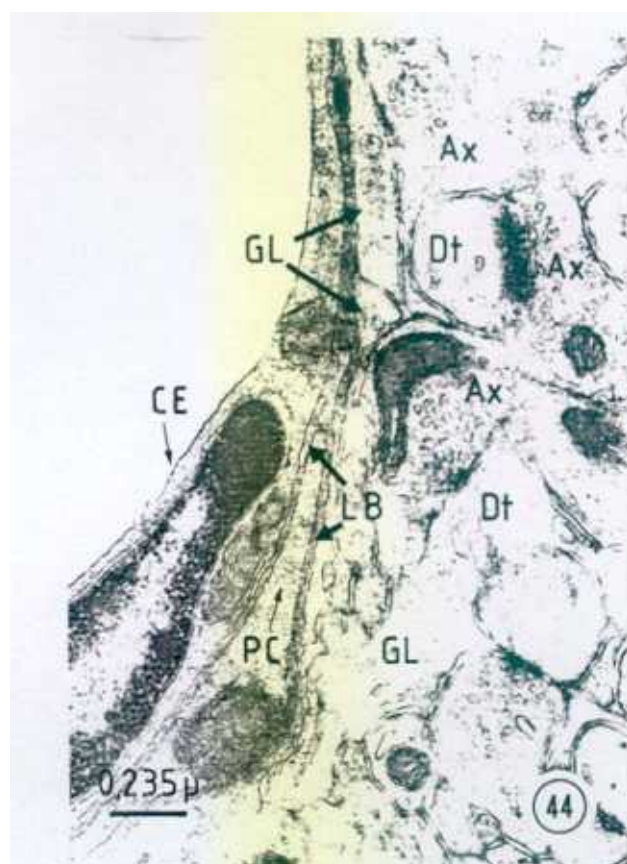
**Fig. 44.-** Glía perivascular [[GL]] interpuesta entre la terminación axónica [[Ax]] y la pared del capilar presente en la capa molecular de la corteza cerebelosa. [[CE = Célula Endotelial, PC = Pericito, Dt = Dendrita]].

**Fig. 45.-** Terminal axónico [[Ax]] en asociación íntima con la membrana basal [[MB]] que rodea al pericito [[PC]], en la capa molecular de la corteza cerebelosa. [[CE = Célula Endotelial, GL = Glía]].

**Fig. 46.-** Microfotografía que muestra la existencia de un terminal axónico [[Ax]] manteniendo contacto con el capilar cerebeloso, en un punto de discontinuidad del envoltorio glial perivascular [[GL]]. [[CE = Célula Endotelial, PC = Pericito, Dt = Dendrita]].

**Fig. 47.-** Botón axónico [[Ax]] en asociación anatómica estrecha con la membrana basal [[MB]] que rodea a la célula endotelial [[CE]]. [[GL = Glía, Dt = Dendrita]].





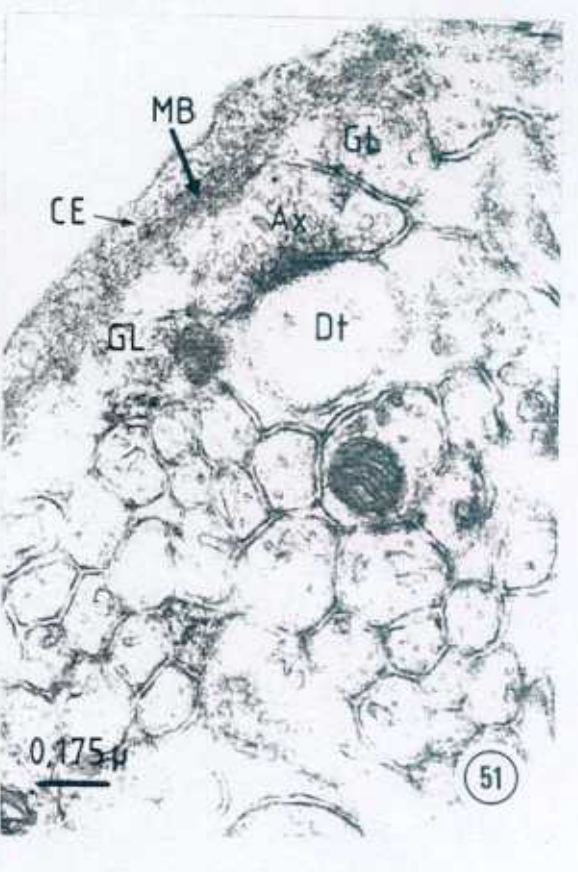
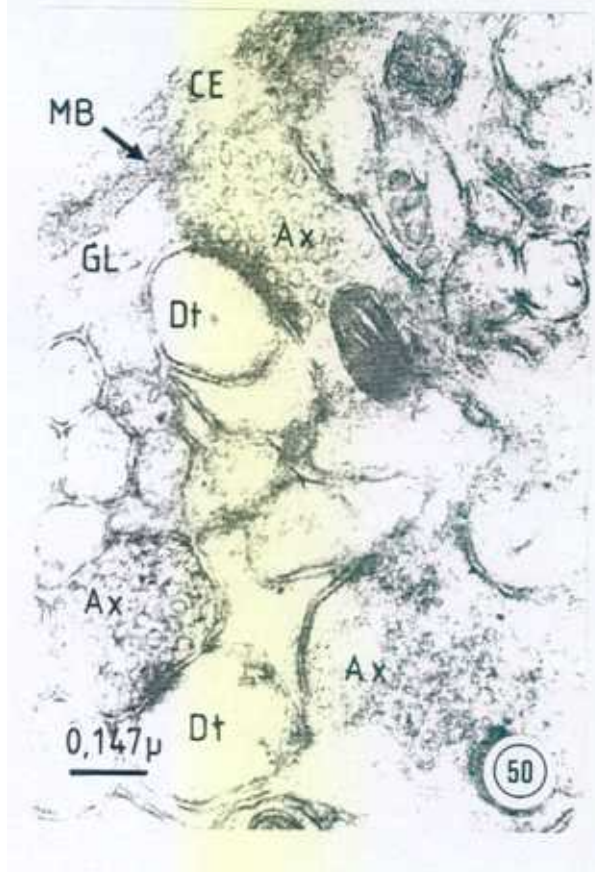
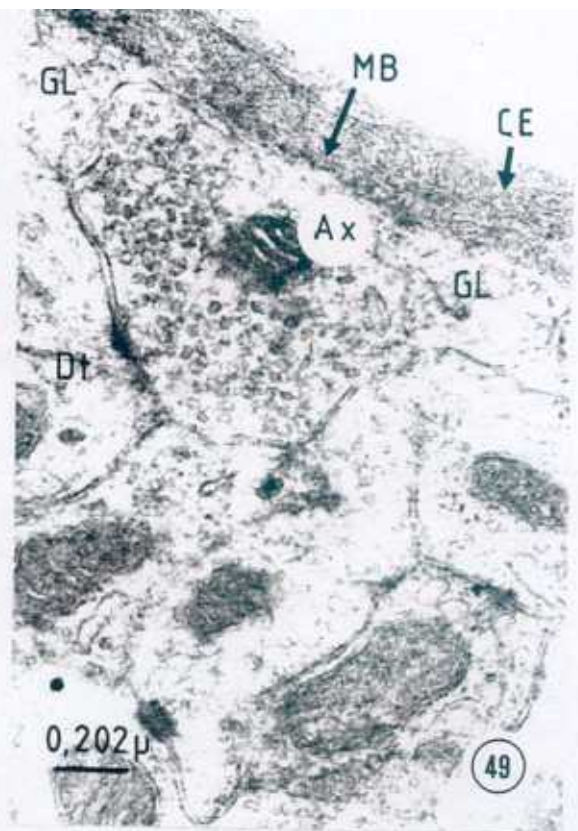
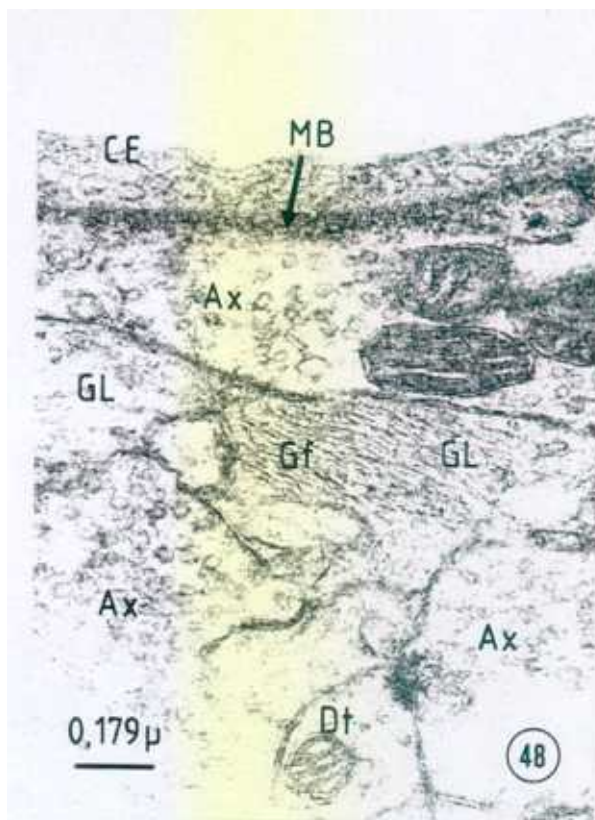
**Fig. 48.-** Detalle ultraestructural de una terminación axónica [Ax] en íntima asociación anatómica con la membrana basal [MB] que se halla envolviendo a la célula endotelial [CE]. [GL = Glía, Gf = Gliofilamentos, Dt = Dendrita].

**Fig. 49.-** Terminación axónica [Ax] asociada a la membrana basal [MB] que rodea a la célula endotelial [CE] en la corteza cerebelosa a nivel de la capa molecular de la laminilla. [GL = Glía].

**Fig. 50.-** Sección fina que constata la presencia en la capa molecular de la corteza cerebelosa de terminaciones axónicas [Ax] en estrecha asociación con la membrana basal [MB] que rodea a la célula endotelial [CE]. [GL = Glía, Dt = Dendrita].

**Fig. 51.-** Microfotografía que muestra una terminación axónica [Ax] asociada íntimamente con la membrana basal [MB] que envuelve a la célula endotelial [CE], en la capa molecular de la corteza cerebelosa. [GL = Glía, Dt = Dendrita].



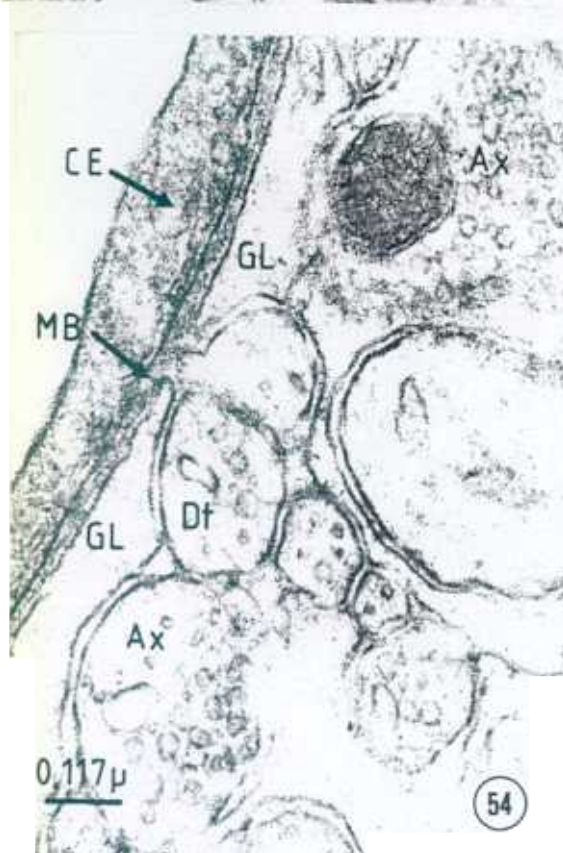
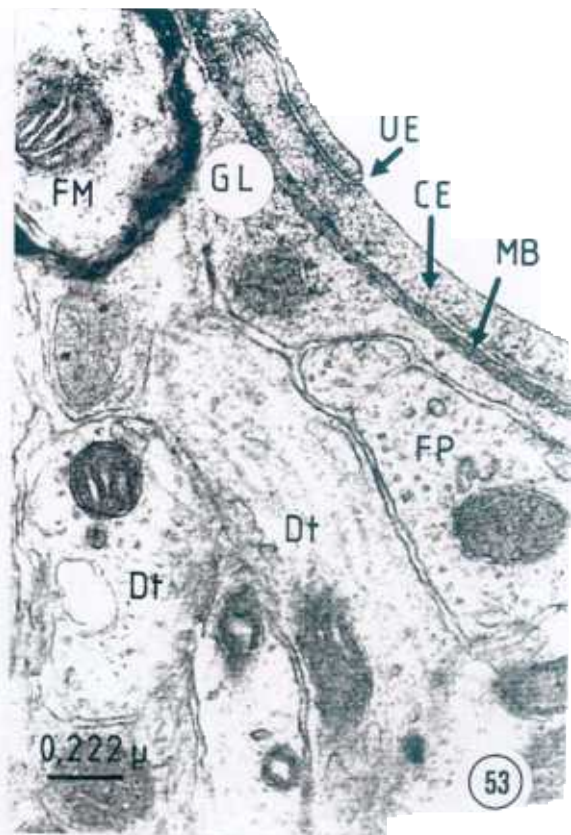
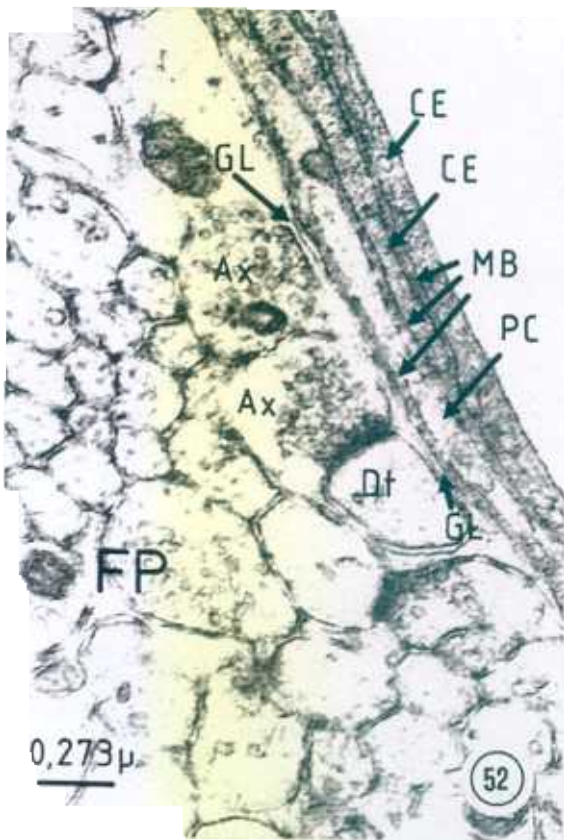


**Fig. 52.-** Axones [[Ax]] y dendritas [[Dt]] de fibras paralelas [[FP]] en el entorno del capilar cerebelosos separados de la célula endotelial [[CE]] y del pericito [[PC]] por un envoltorio de glía perivascular [[GL]]. [[MB = Membrana Basal]].

**Fig. 53.-** Fibras paralelas [[FP]] separadas de la pared vascular por la presencia de una vaina interpuesta de naturaleza glial [[GL]], en la capa molecular de la corteza cerebelosa. [[UE = Unión estrecha, MB = Membrana basal, Dt = Dendrita, FM = Fibra Mielínica]].

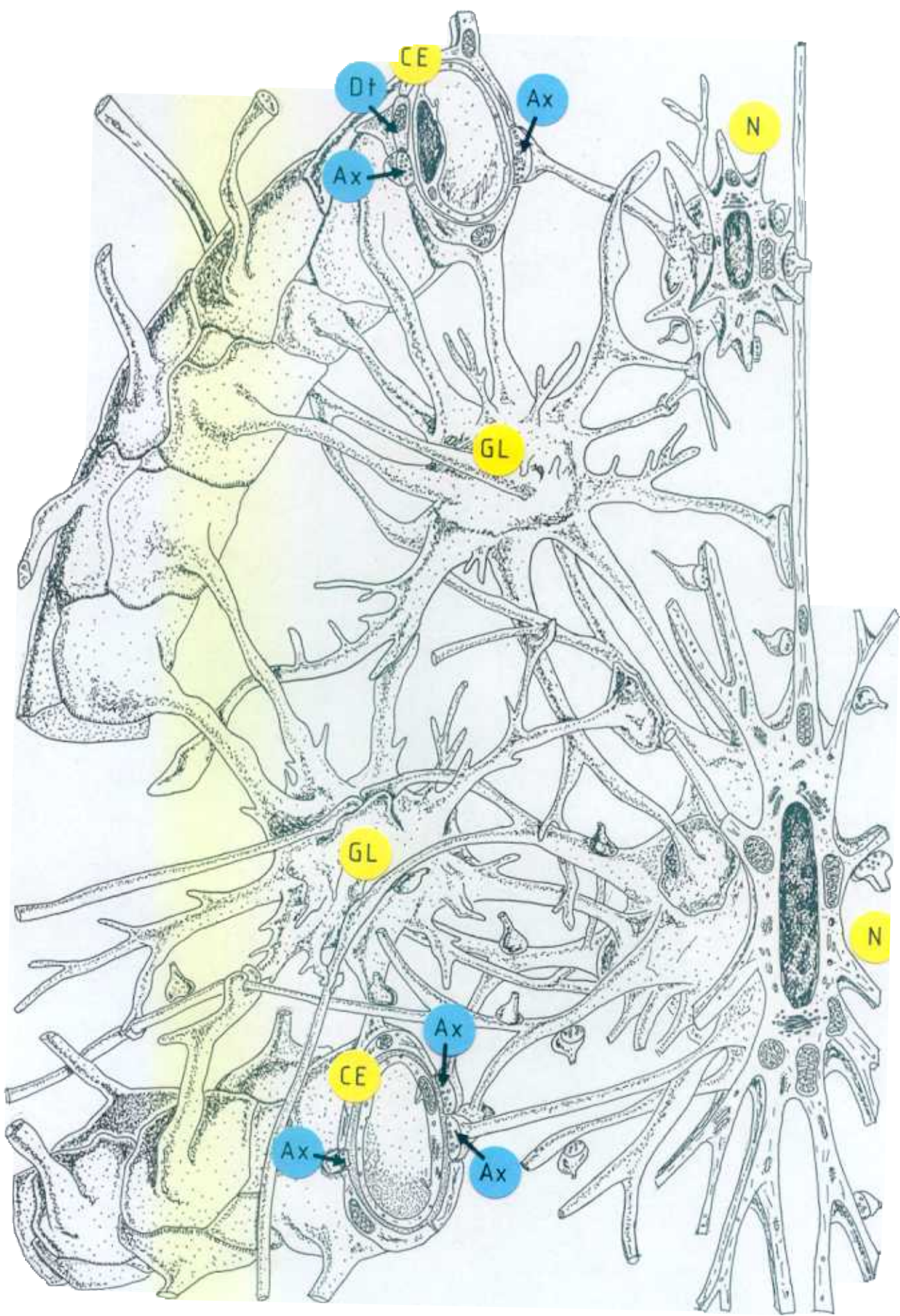
**Fig. 54.-** Sección fina de la corteza cerebelosa a nivel de la capa molecular en la que se pone de manifiesto la presencia de una dendrita [[Dt]] en contacto íntimo con la membrana basal [[MB]] que rodea a la célula endotelial [[CE]]. Nótese la patente discontinuidad del envoltorio de la glía perivascular [[GL]] [[Ax = Terminaciones axónicas]].





**Esquema I.-** Esquema ilustrativo que representa las prolongaciones gliales abrazando a los capilares presentes en el tejido nervioso. El envoltorio glial no resulta del todo continua, y puede representarse elementos de naturaleza nerviosa asociados a la pared vascular. [[CE = Célula endotelial, GL = células gliales, N = Células de naturaleza nerviosa, Ax = Axón, Dt = Dendrita]].





**Esquema II.-** Diagrama esquemático que representa la corteza cerebelosa en sección tridimensional. Los capilares cerebelosos se hallan rodeados por el envoltorio glial perivascular [[GL]]; sin embargo esta vaina no constituye una estructura continua en toda su extensión.

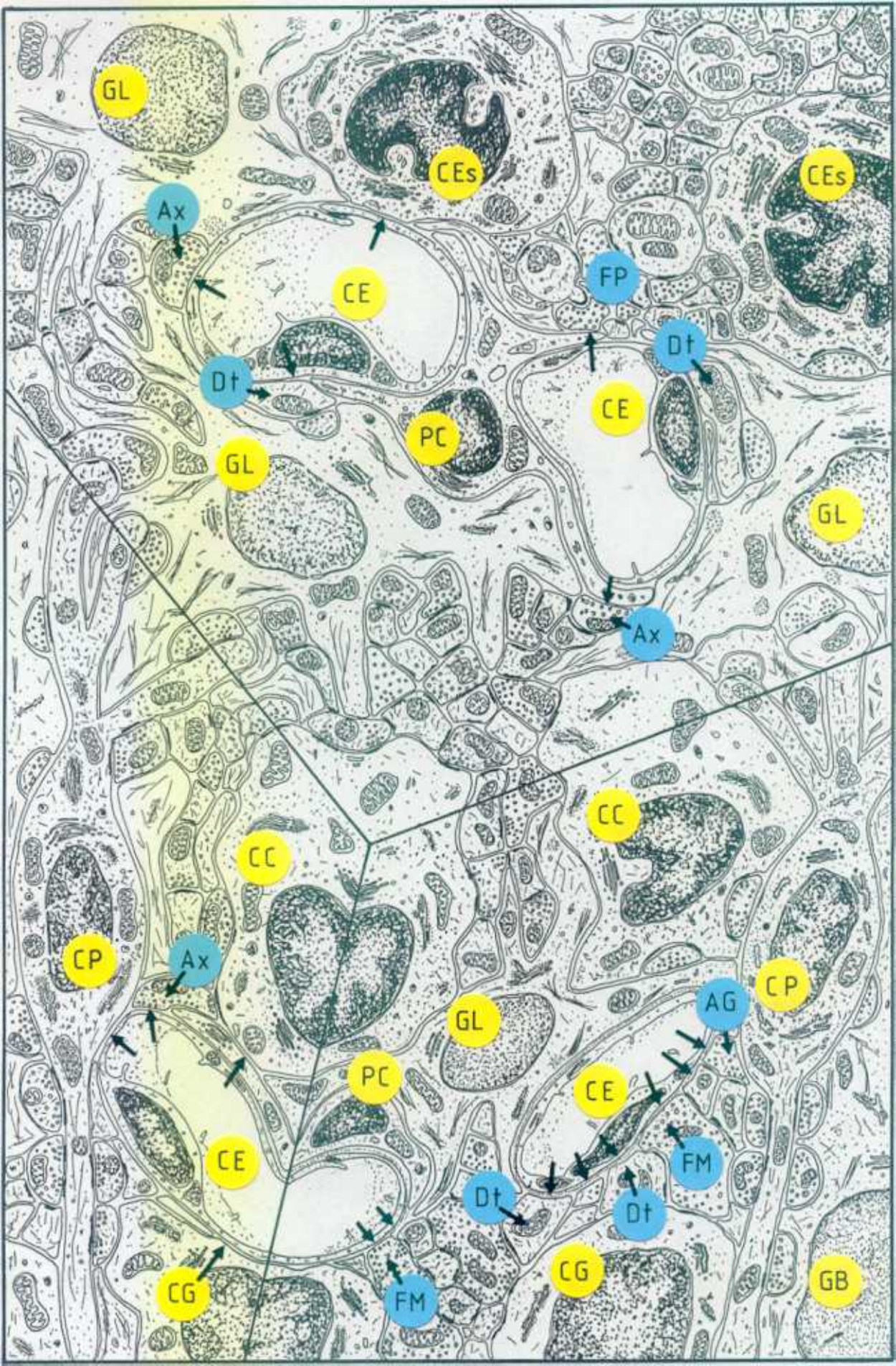
En la capa molecular superficial se muestran somas neuronales de células estrelladas [[CEs]] y células cesto [[CC]] asociadas a la pared vascular. Así mismo, elementos de naturaleza nerviosa, dendritas [[Dt]] y terminaciones axónicas [[Ax]].

En la capa de las células de Purkinje el diagrama representa somas de esta estirpe celular [[CP]], así como axones de células cesto, en contacto con los capilares sanguíneos.

En la capa granular de la corteza cerebelosa se esquematiza células grano [[CG]], axones [[Ax]] y dendritas [[Dt]] de origen diverso, fibras musgosas [[FM]] y axones de células Golgi [[AG]], asociadas íntimamente a la pared de los capilares cerebelosos. El esquema no representa a las células Golgi presentes en la capa granular profunda de la corteza cerebelosa y que pueden mantener contacto con los capilares sanguíneos.

[[GB ≈ Glía de Bergmann, CE = Célula Endotelial, PC = Pericito]].





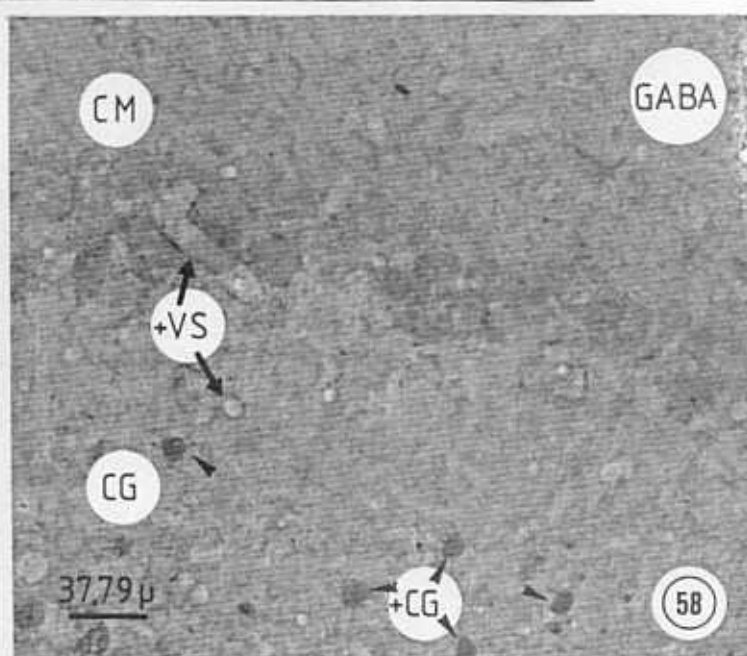
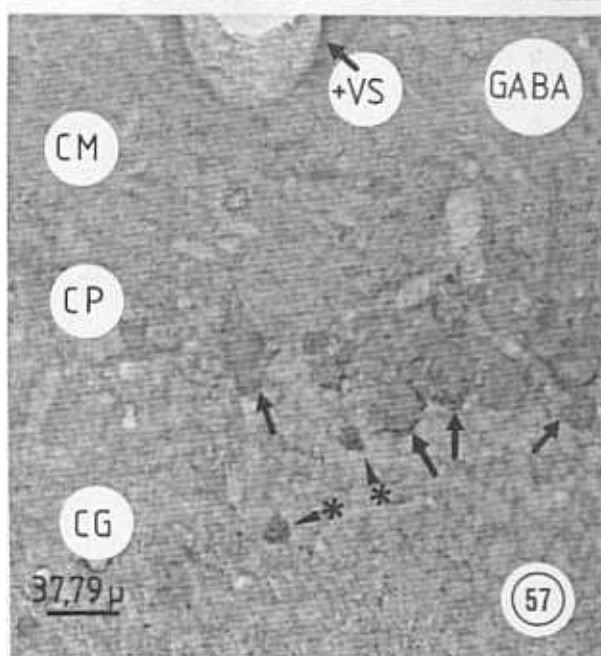
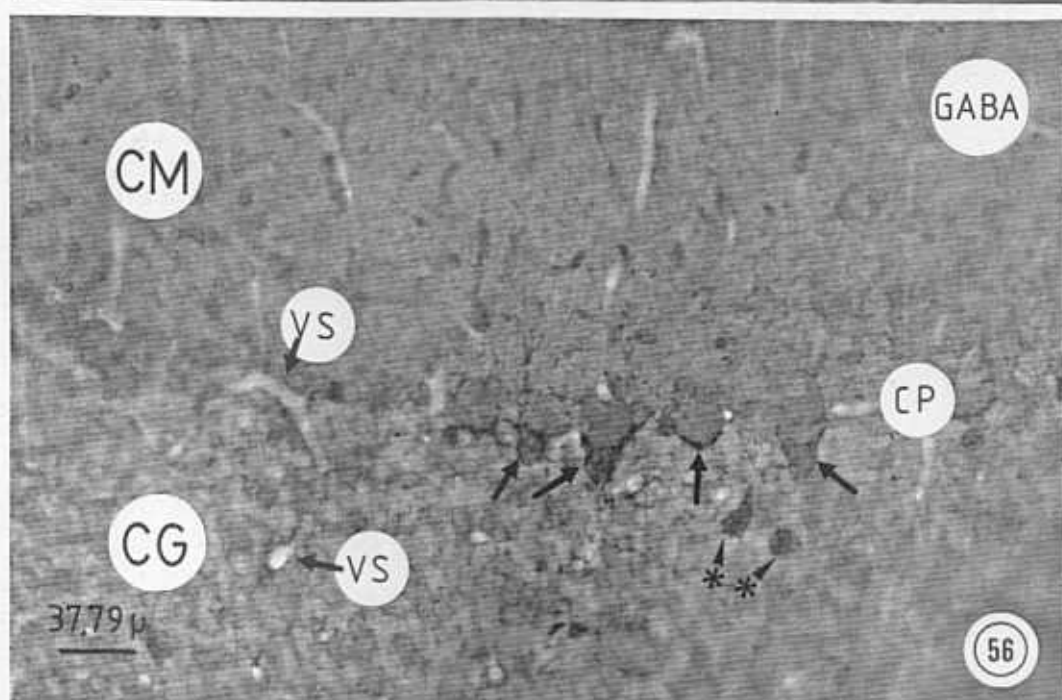
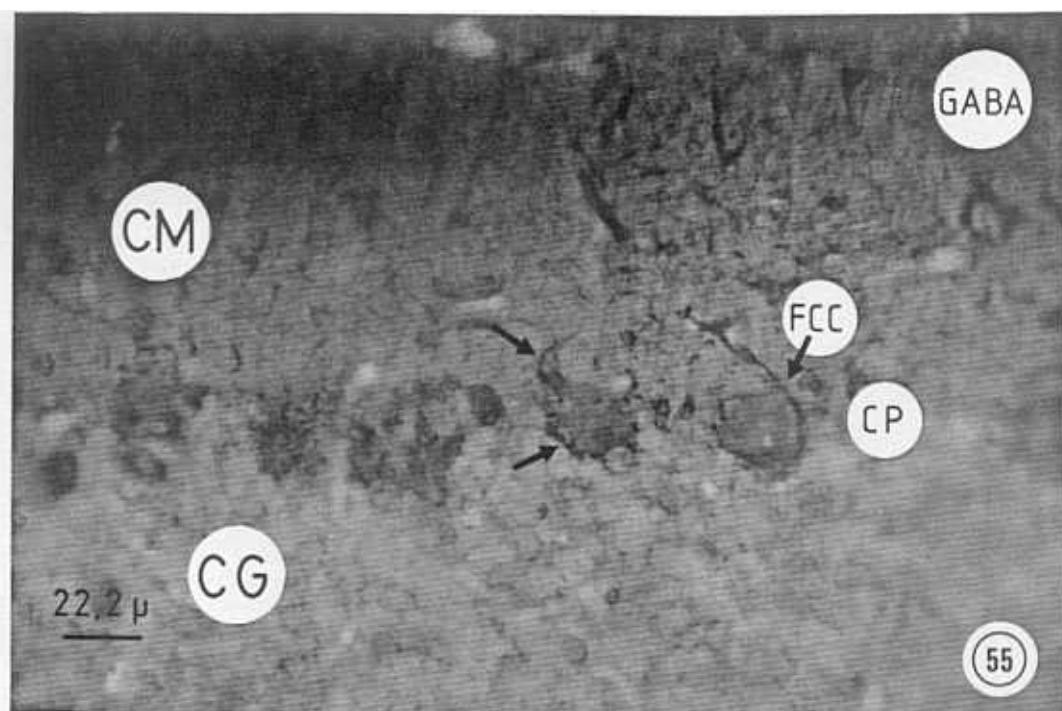
**Fig. 55.-** Fotografía a microscopía óptica de la inmunolocalización de GABA en la corteza cerebelosa. Las células de Purkinje [CP] aparecen ligeramente inmunomarcadas, observándose intenso inmunomarcaje en las fibras de células cesto [FCC]. [CM = Capa molecular, CG = Capa granular].

**Fig. 56.-** Inmunolocalización de GABA en la corteza cerebelosa. El producto de la inmunorreacción aparece en el cono axonal de las células de Purkinje [CP], así como en fibras que rodean a esta estirpe celular, y en células grano [\*]. Se observa inmunomarcaje en algunos vasos sanguíneos [VS] y en estructuras asociadas a los mismos. [CM = Capa Molecular, CP = Células de Purkinje, CG = Capa Granular].

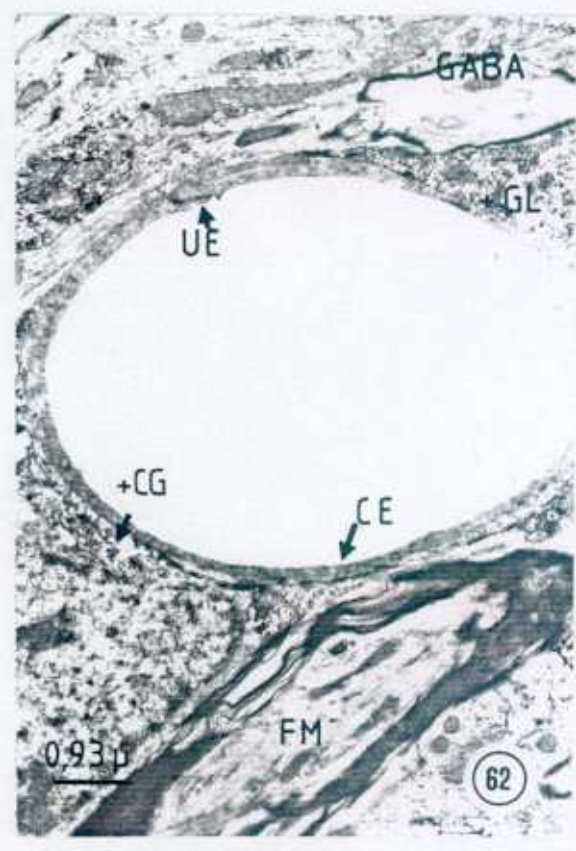
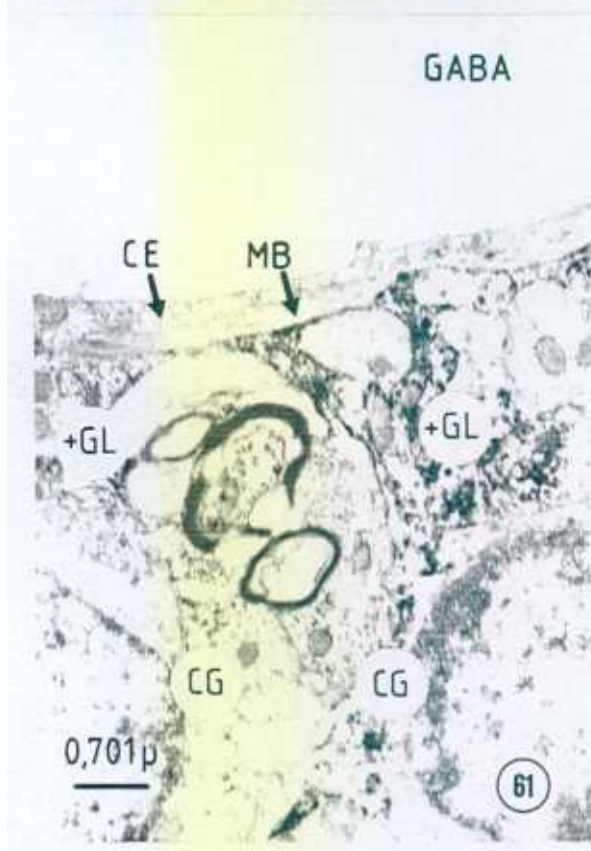
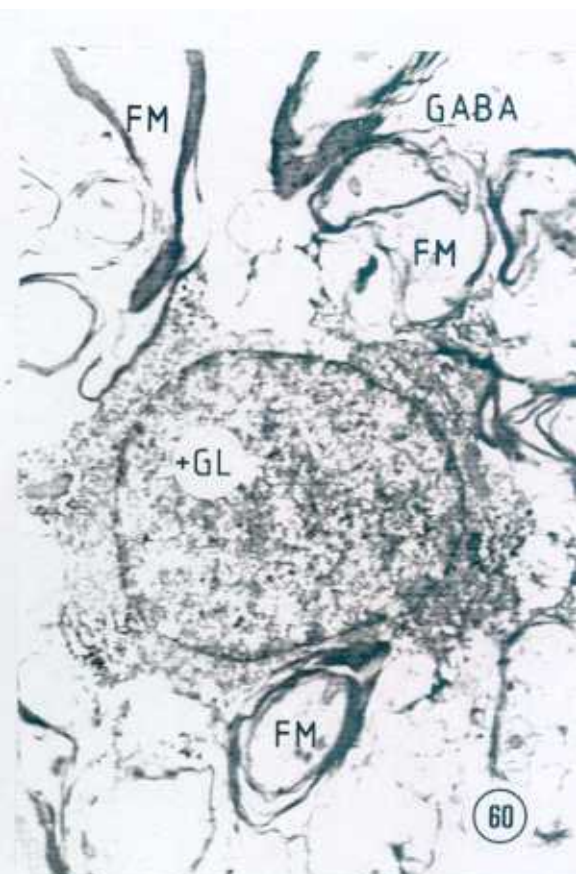
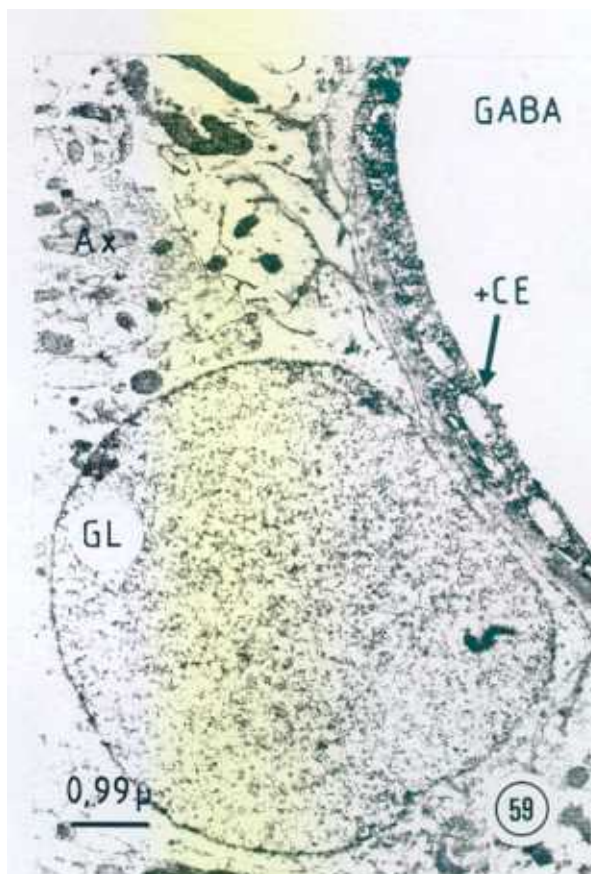
**Fig. 57.-** Localización inmunocitoquímica de GABA en el cono axonal de las células de Purkinje [↗], en células grano [\*] y en el endotelio de los capilares cerebelosos [VS]. [CM = Capa molecular, CP = Células de Purkinje, CG = Capa granular].

**Fig. 58.-** Inmunodetección de GABA en la corteza cerebelosa. La reacción aparece asociada a las células grano [+CG] y a estructuras celulares asociadas a los vasos sanguíneos [VS]. [CM = Capa Molecular, CG = Capa Granular].



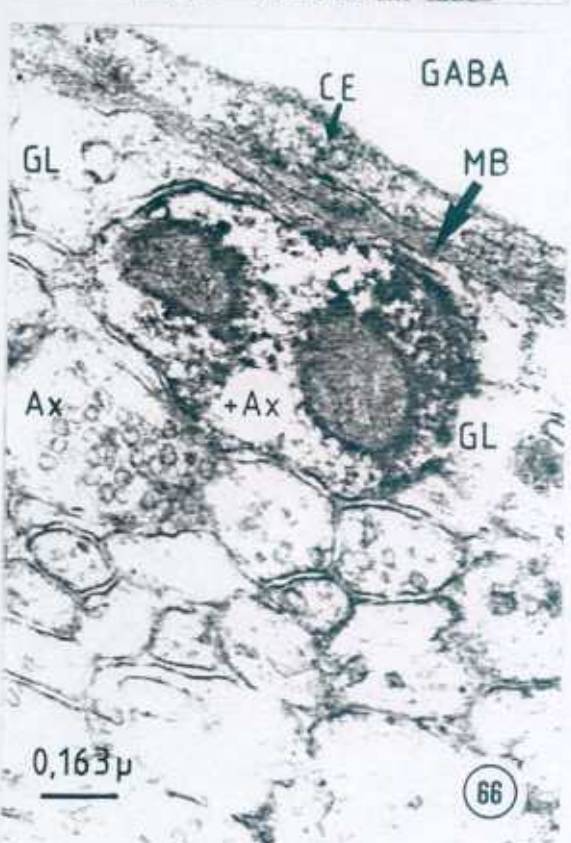
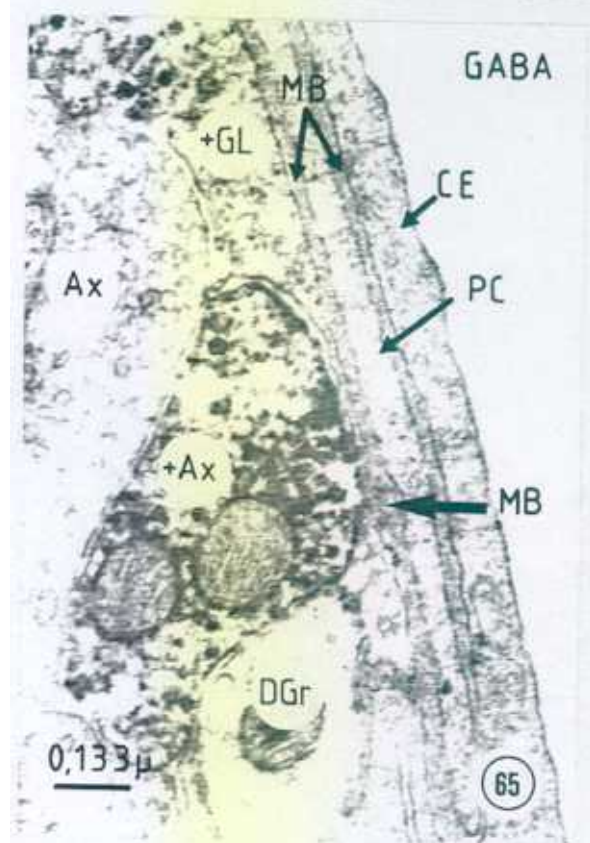
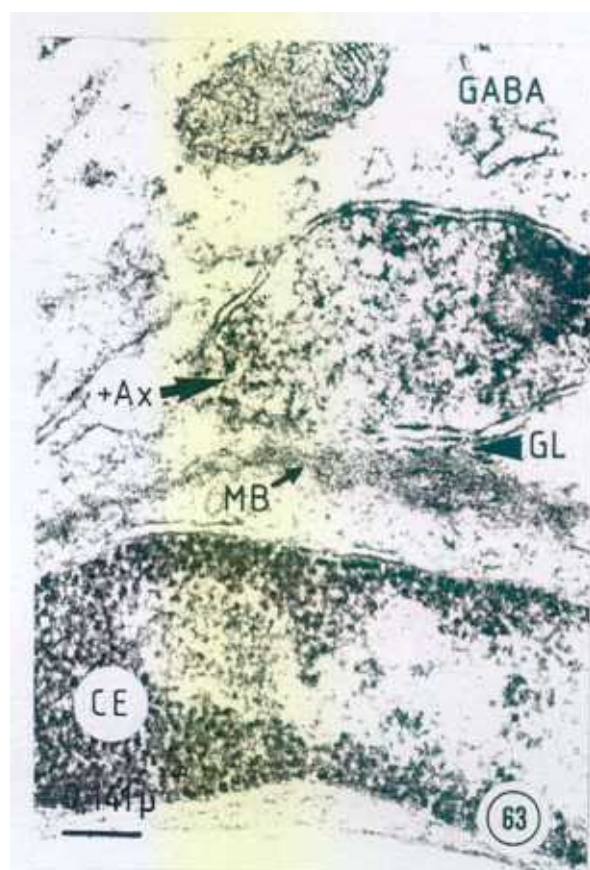


- Fig. 59.-** Localización ultraestructural de GABA en el citoplasma de la célula endotelial **[[+CE]]** de un capilar en la capa molecular de la corteza cerebelosa. El producto de la inmunorreacción aparece distribuido de forma homogénea a lo largo del citoplasma. **[[GL = Glía, Ax = terminación axónica]]**.
- Fig. 60.-** Célula glial **[[+GL]]** presente en la sustancia blanca cerebelosa inmunopositiva frente a GABA. La reacción aparece dispersa por todo el citoplasma glial. **[[FM = Fibras mielínicas]]**.
- Fig. 61.-** Prolongaciones de la glía perivascular **[[+GL]]** inmunopositivas frente a GABA asociadas al capilar presente en la capa granular de la corteza cerebelosa. **[[CG = Célula Grano, CE = Célula Endotelial, MB = Membrana basal]]**.
- Fig. 62.-** Microfotografía que muestra la localización del inmunomarcaje frente a GABA en la corteza. El producto de la inmunorreacción aparece asociado tanto a las prolongaciones de la glía perivascular **[[+GL]]**, como en el citoplasma de una célula grano **[[+CG]]** en contacto íntimo con la célula endotelial **[[CE]]**. **[[UE = Unión Estrecha, FM = Fibra Mielínica]]**.



- Fig. 63.-** Terminación axónica inmunopositiva frente a GABA [+Ax] en el entorno del capilar cerebeloso, separado de este mediante la presencia de glía perivascular interpuesta [GL]. [CE = Célula Endotelial, MB = Membrana Basal].
- Fig. 64.-** Immunolocalización de una terminación positiva frente a GABA [+Ax] separada de la célula endotelial [CE] por la presencia de glía perivascular interpuesta [GL]. [MB = Membrana basal, Dt = Dendrita].
- Fig. 65.-** Terminación axónica positiva frente a GABA [+Ax] asociada íntimamente a la membrana basal [MB] que rodea al pericito [PC] y la célula endotelial [CE]. Se observa reacción positiva también en la glía perivascular cercana [+GL]. [DGr = Dendrita de Célula Grano].
- Fig. 66.-** Localización citoquímica de GABA en un terminal axónico [+Ax] en la capa molecular de la corteza cerebelosa asociado estrechamente a la pared del capilar [CE = Célula Endotelial, MB = Membrana basal, GL = Glía].





**Fig. 67.-** Inmunolocalización de GAD en la corteza cerebelosa. La reacción se observa asociada a las células de Purkinje **[[+CP]]** y a diversos elementos celulares asociados a los capilares cerebelosos **[[↗]]**. **[[CM = Capa Molecular, CG = Capa granular]]**.

**Fig. 68.-** Localización inmunocitoquímica de GAD en los capilares sanguíneos **[[+VS]]** de la corteza cerebelosa.

**Fig. 69.-** Célula endotelial positiva frente al antisuero contra GAD en los capilares cerebelosos. La reacción se observa también en prolongaciones celulares que alcanzan la pared vascular **[[►]]**.

**Fig. 70.-** Inmunolocalización de GAD en el endotelio de un capilar cerebeloso **[[+CE]]** y en células y prolongaciones asociadas a la pared vascular **[[►]]**.



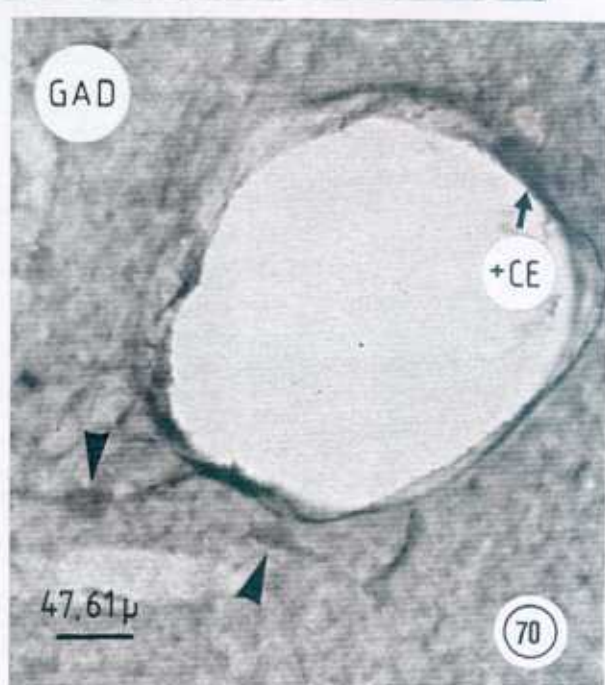
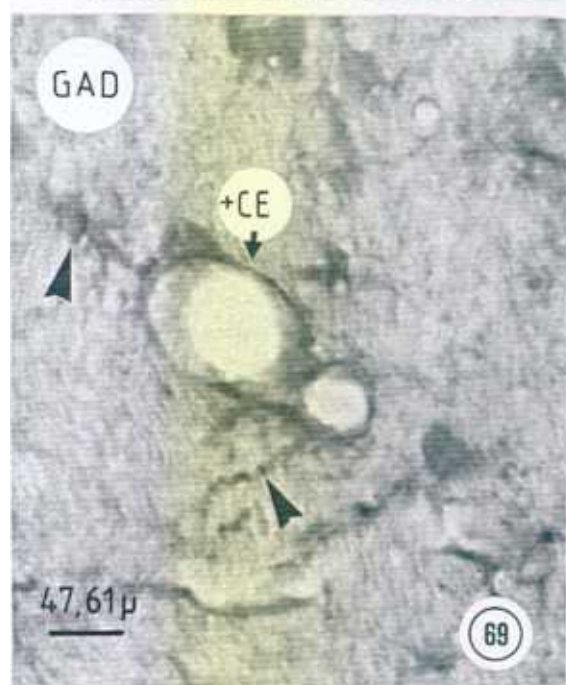
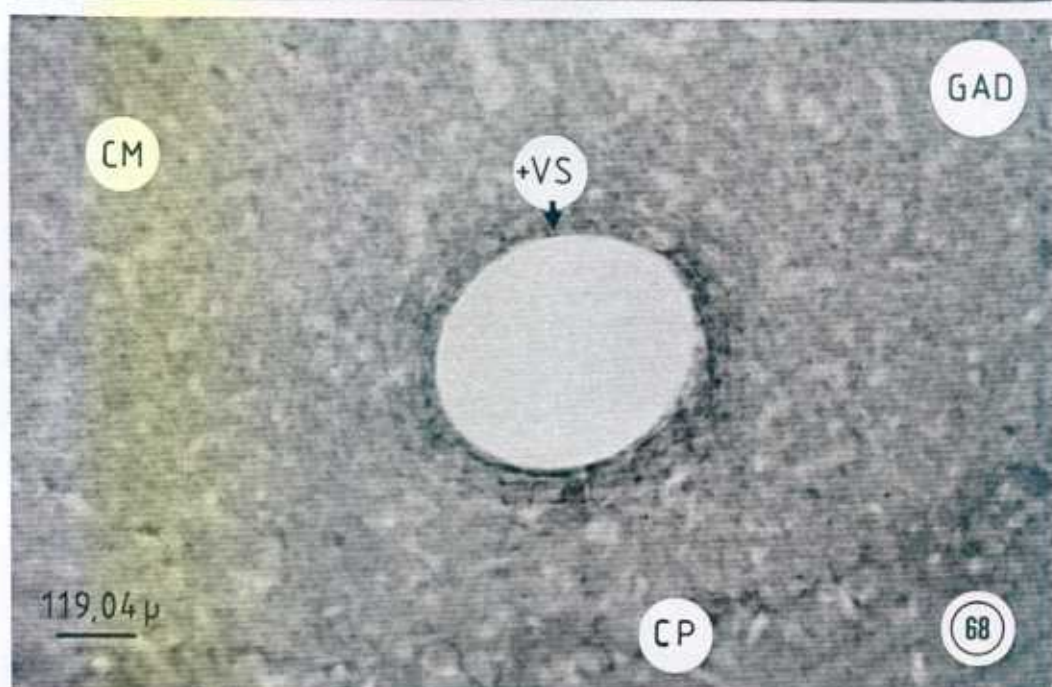
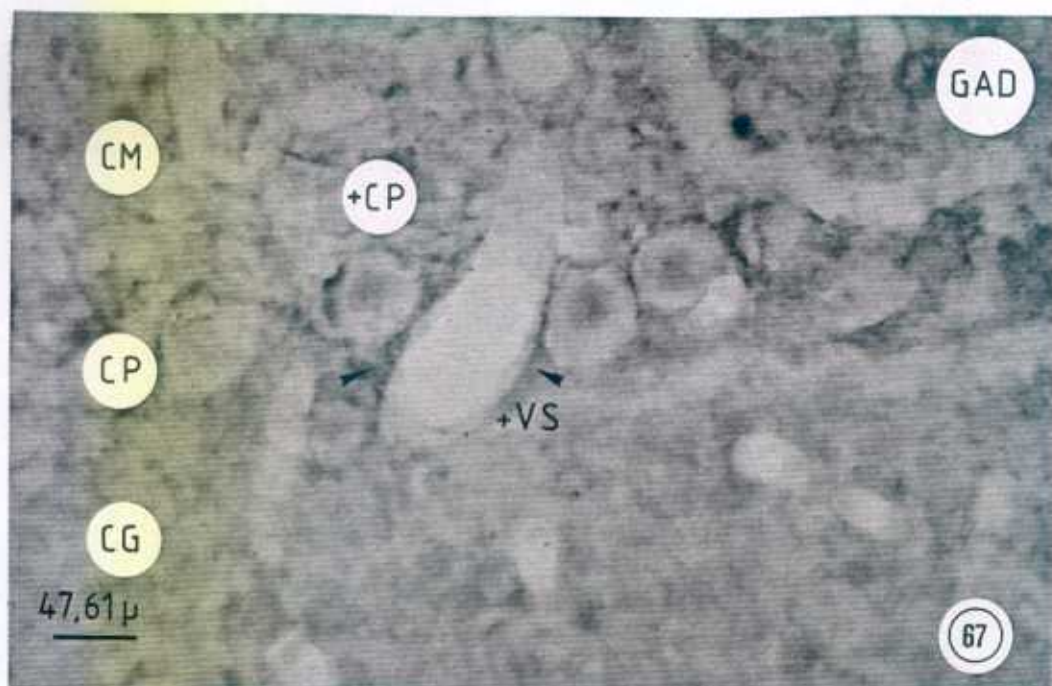
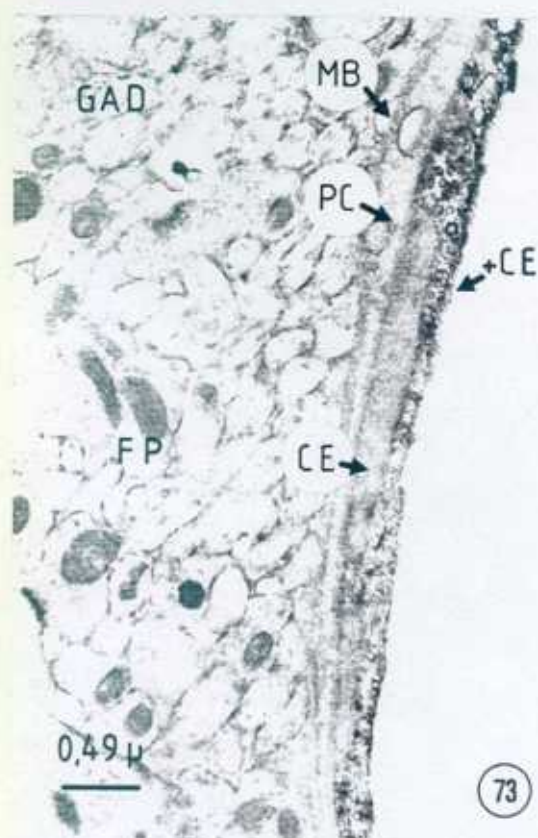
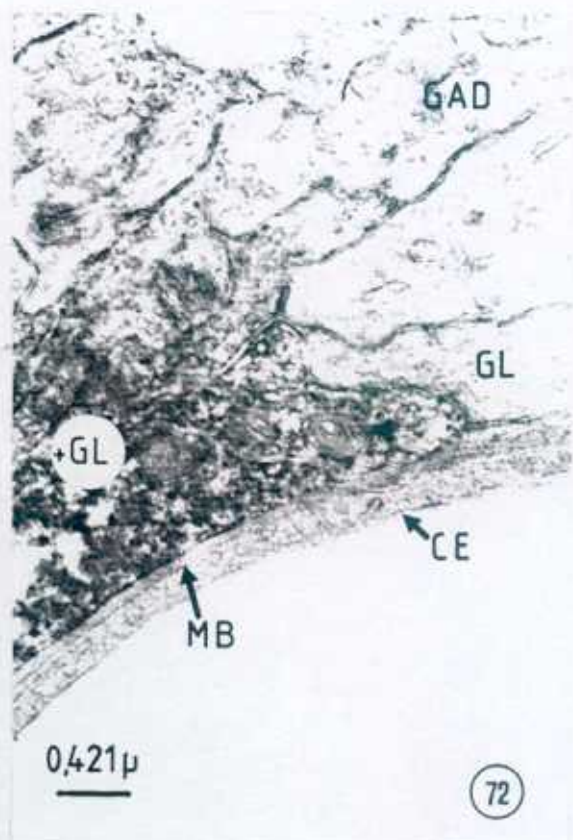
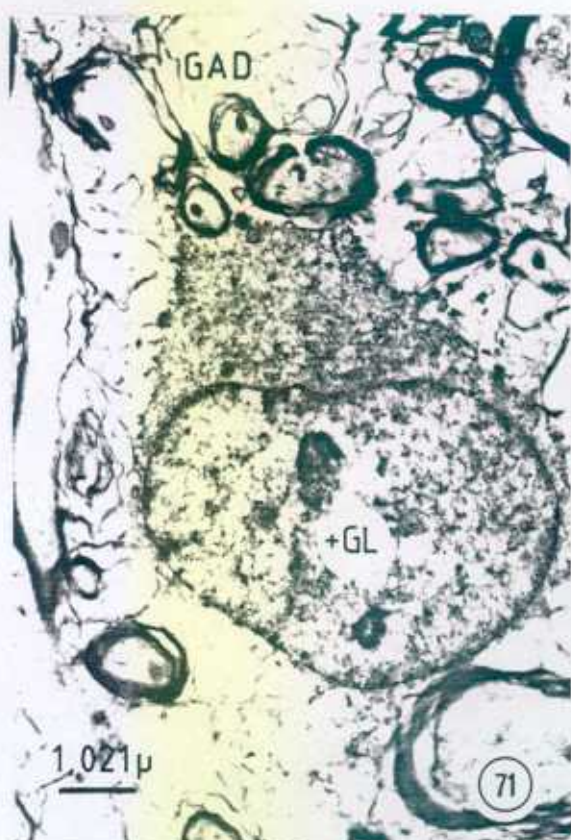


Fig. 71.- Célula Glial presente en la sustancia blanca, inmunomarcada para GAD [[+GL]]. El producto del inmunomarcaje aparece distribuido de forma homogénea en todo el citoplasma glial.

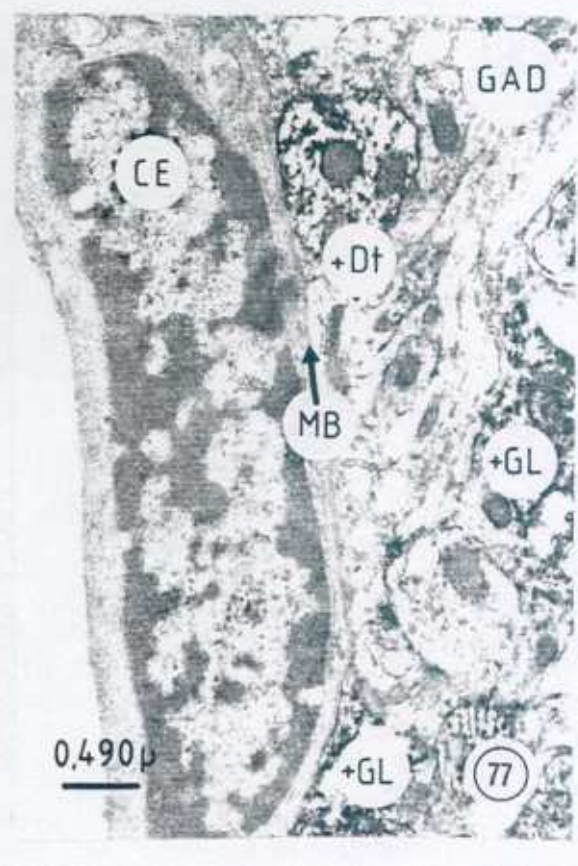
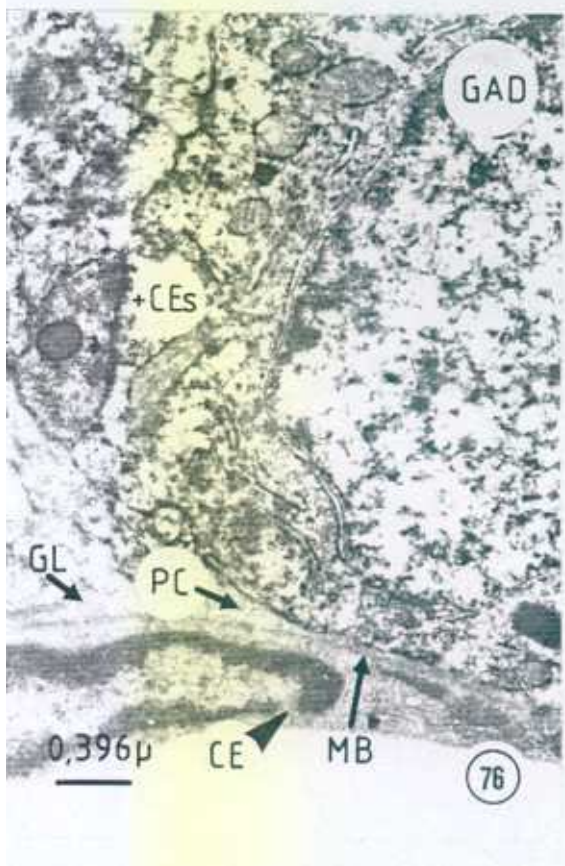
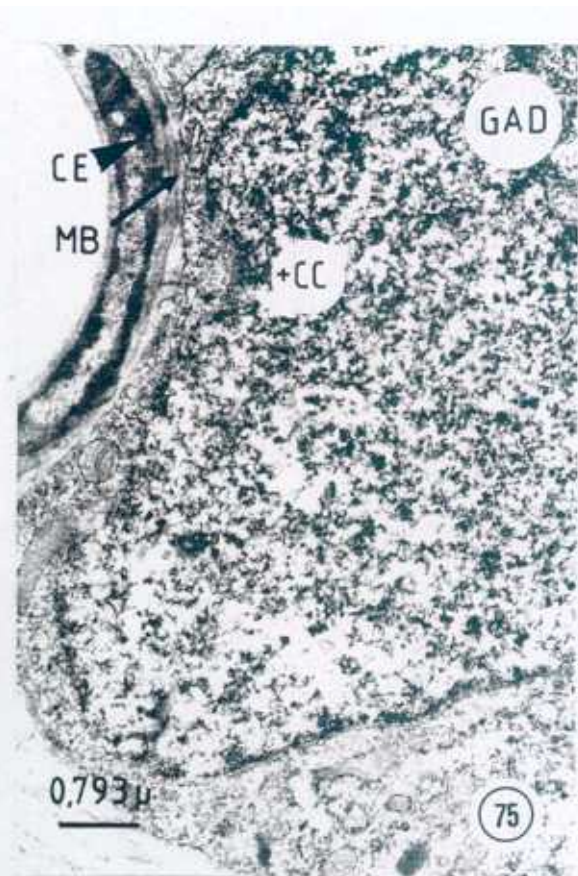
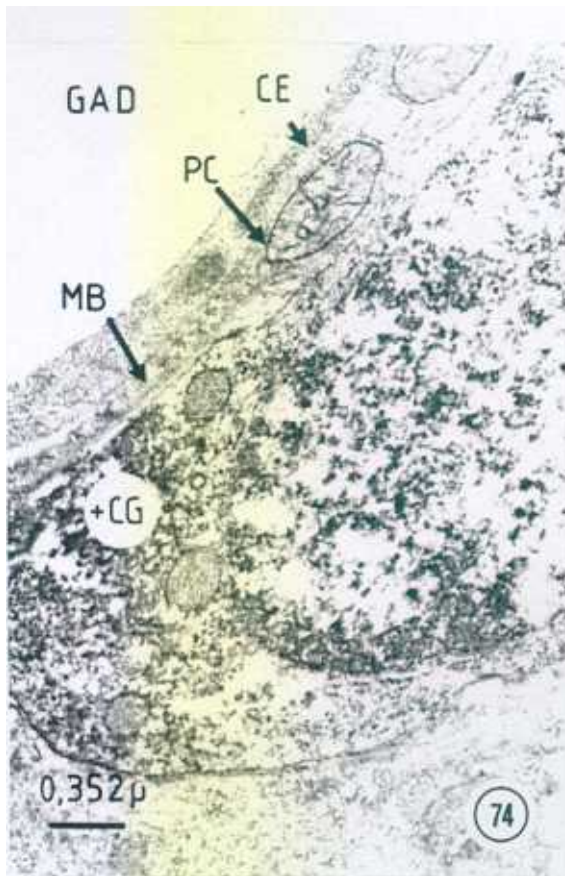
Fig. 72.- Prolongación glial inmunoteñida para GAD [[+GL]] alrededor del capilar cerebeloso. El marcaje se observa homogéneamente distribuido en todo el citoplasma. [[CE = Célula endotelial, MB = Membrana Basal, GL = Glía]].

Fig. 73.- Endotelio de un capilar presente en la capa molecular de la corteza cerebelosa inmunomarcado para GAD [[+CE]]. El producto de la homogénea se observa con una distribución dispersa aunque asociado principalmente a las numerosas vesículas membranosas. [[CE = Célula Endotelial, PC = Pericito, MB = Membrana Basal, FP = Fibras Paralelas]].



- Fig. 74.-** Célula Grano marcada inmunocitoquímicamente con el antisuero frente a GAD  $[[+CG]]$  y manteniendo estrecho contacto con la membrana basal  $[[MB]]$  que rodea a la célula endotelial  $[[CE]]$  y al pericito  $[[PC]]$ .
- Fig. 75.-** Inmunolocalización de GAD en célula cesto  $[[+CC]]$  asociada íntimamente con la membrana basal  $[[MB]]$  que rodea a la célula endotelial  $[[CE]]$ .
- Fig. 76.-** Localización ultraestructural de una célula estrellada marcada inmunocitoquímicamente con el antisuero frente a GAD  $[[+CEs]]$  y asociada a la membrana basal  $[[MB]]$  que rodea a la pared vascular  $[[CE = Célula Endotelial, PC = Pericito, GL = Glía]]$ .
- Fig. 77.-** Inmunodetección de GAD en la corteza cerebelosa. Obsérvese reacción positiva en dendritas  $[[+Dt]]$  asociadas íntimamente a la pared del capilar y en prolongaciones de células gliales  $[[+GL]]$  alrededor del capilar y rodeando otras estructuras de naturaleza nerviosa.  $[[CE = Célula Endotelial, MB = Membrana Basal]]$ .





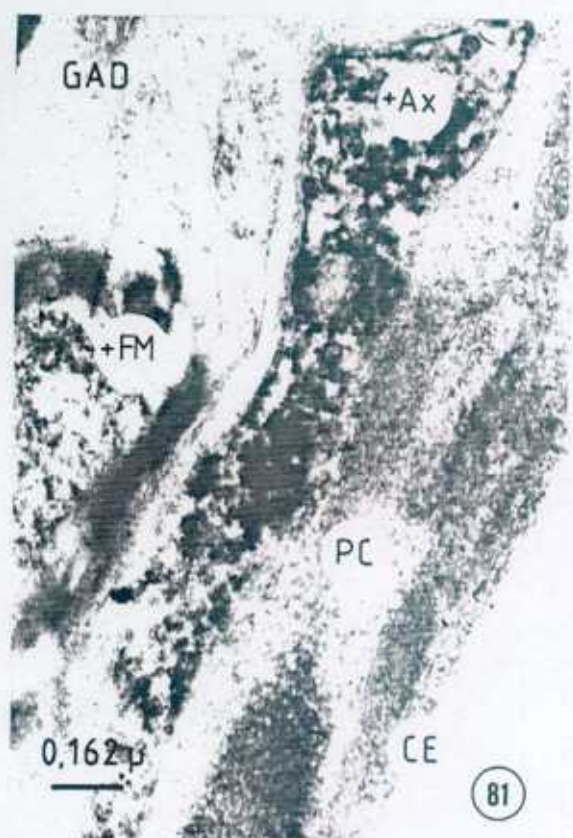
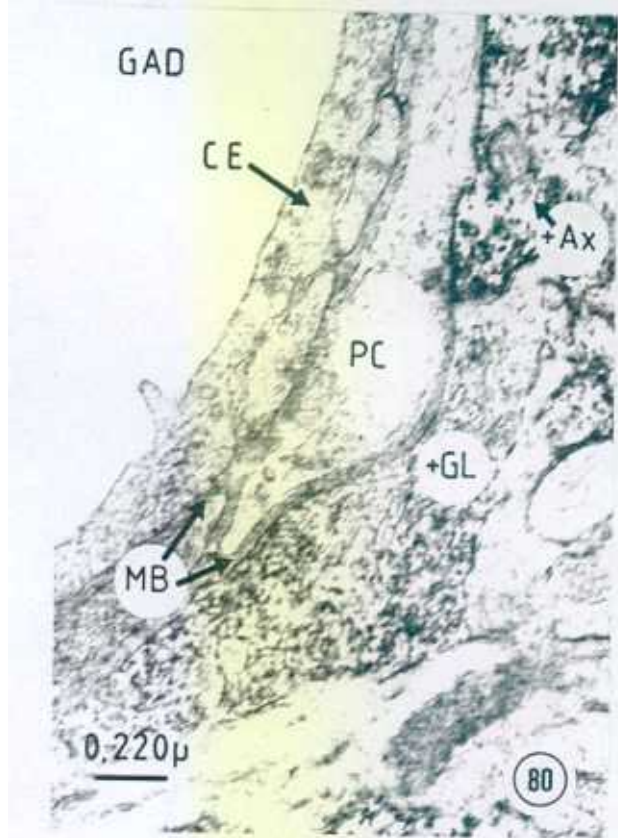
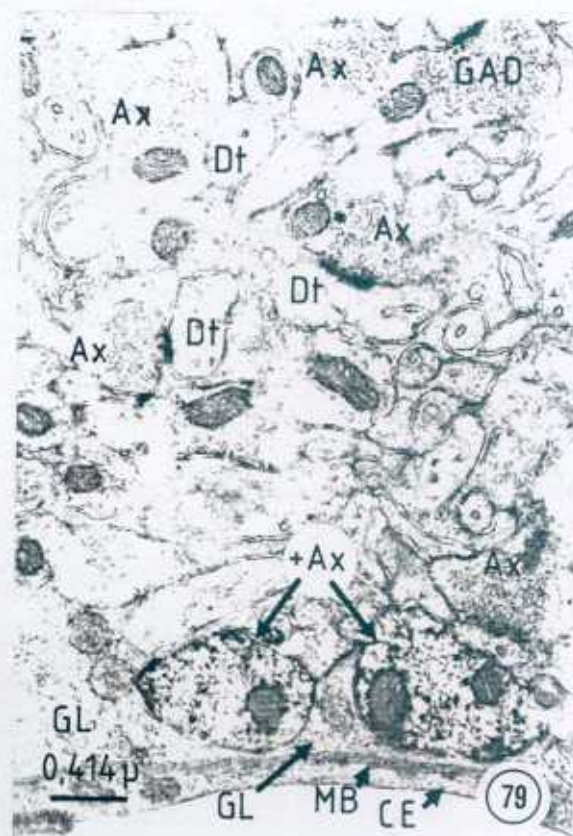
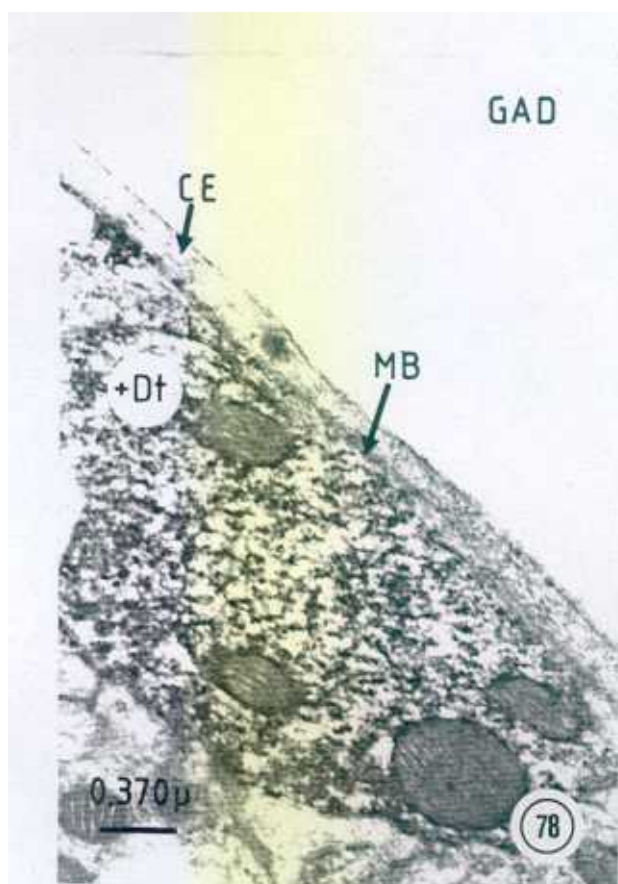
**Fig. 78.-** Citoplasma dendrítico inmunoteñido con el antisuero contra GAD [+Dt] y asociado íntimamente con la membrana basal [MB] que rodea a la célula endotelial [CE]. El producto de la inmunorreacción aparece disperso por todo el citoplasma dendrítico y asociado a la cara citoplásmica de la membrana mitocondrial externa.

**Fig. 79.-** Terminaciones axónicas positivas frente a GAD en el entorno del capilar cerebeloso [+Ax], pero separadas de este por la glía perivascular interpuesta [GL]. [CE = Célula Endotelial, MB = Membrana Basal, Ax = Axón, Dt = Dendrita].

**Fig. 80.-** Inmunolocalización de GAD en el entorno de los capilares cerebelosos. La reacción positiva se observa en el interior de una terminación axónica [+Ax] asociada a la membrana basal [MB] que rodea al pericito [PC] y en la glía perivascular cercana [+GL]. [CE = Célula Endotelial].

**Fig. 81.-** Localización inmunocitoquímica de GAD en el microambiente de los capilares cerebelosos. La reacción positiva se observa en una fibra mielínica [+FM] y en una terminación axónica [+Ax] asociada íntimamente a la pared vascular. El producto de la inmunorreacción se observa asociado a las vesículas sinápticas presentes en el terminal. [CE = Célula endotelial, PC = Pericito].

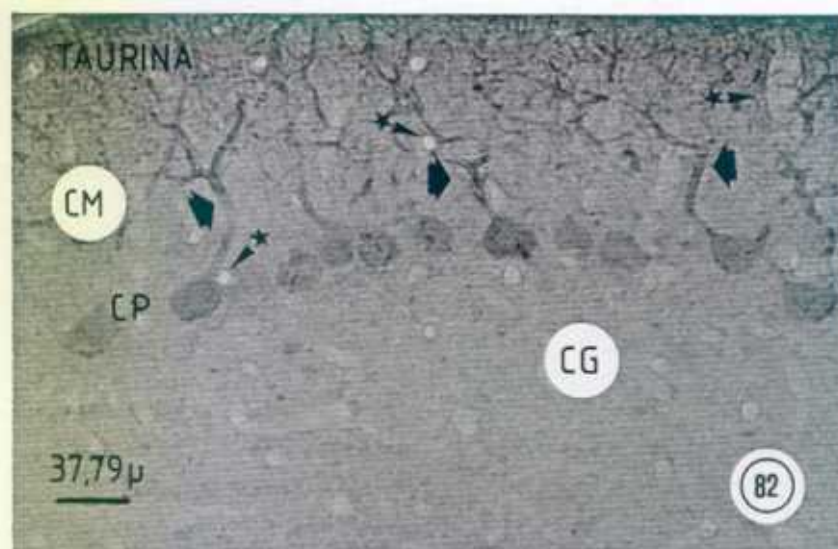




**Fig. 82.-**Fotografía a microscopía óptica de la distribución de inmunomarcaje para Taurina. Las células de Purkinje [CP] y sus árboles dendríticos apicales aparecen marcados positivamente. Nótese reacción positiva alrededor de algunos capilares cerebelosos [★]. [CM = Capa Molecular, CG = Capa Granular].

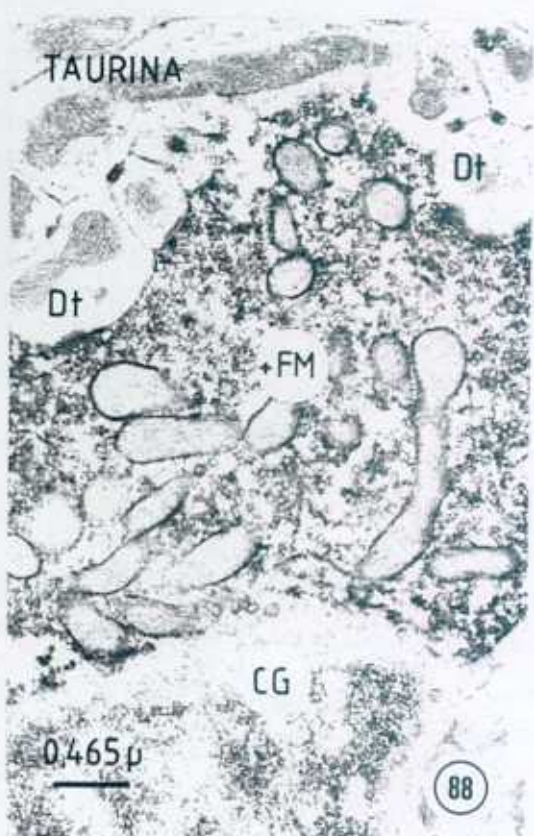
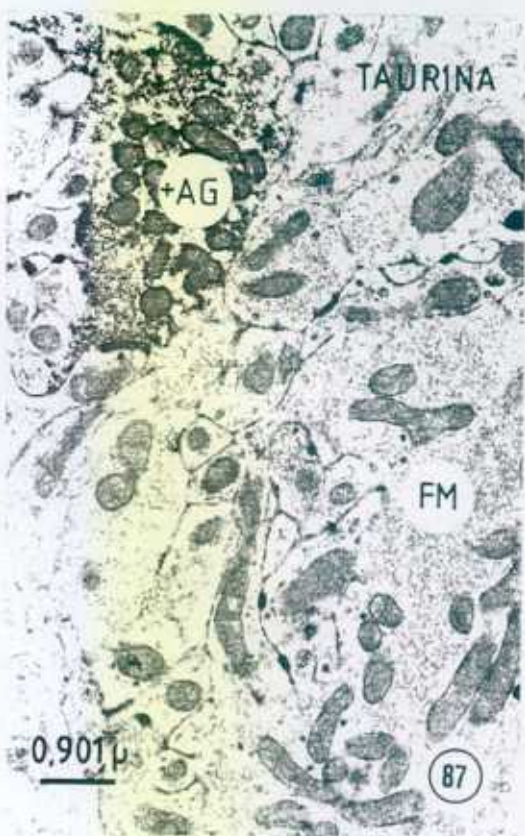
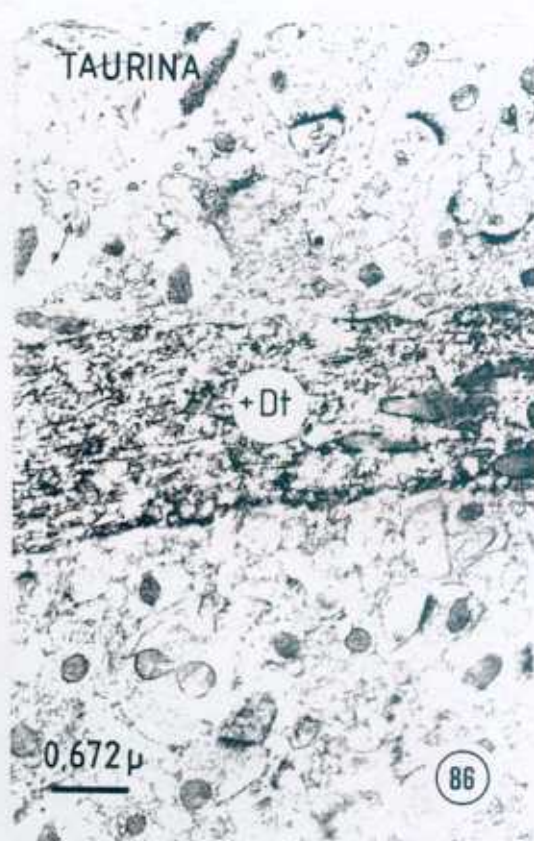
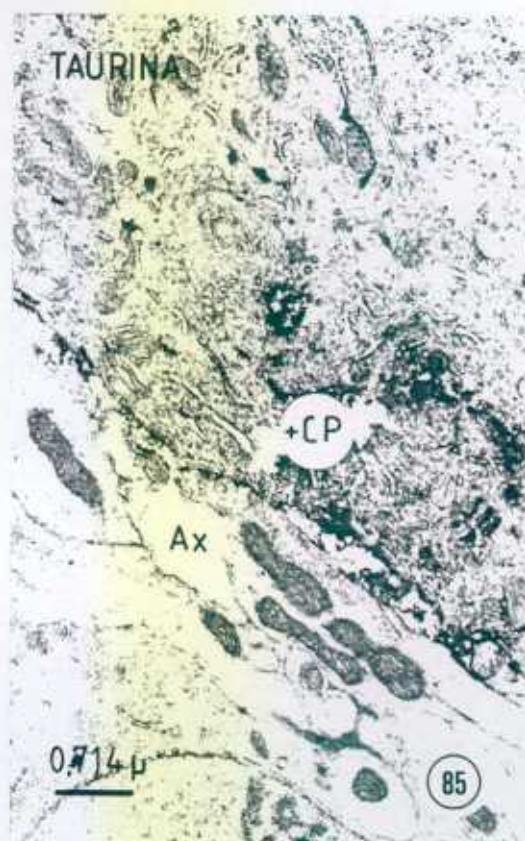
**Fig. 83.-** Célula endotelial positiva frente a Taurina en la corteza cerebelosa. Nótese la presencia de prolongaciones celulares positivas alcanzando la pared capilar [↖].

**Fig. 84.-** Estructuras celulares positivas frente a Taurina en asociación con los capilares de la corteza cerebelosa [▲]. Obsérvese la presencia de dendritas de gran calibre, pertenecientes a células de Purkinje en la capa molecular de la laminilla cerebelosa [↖].



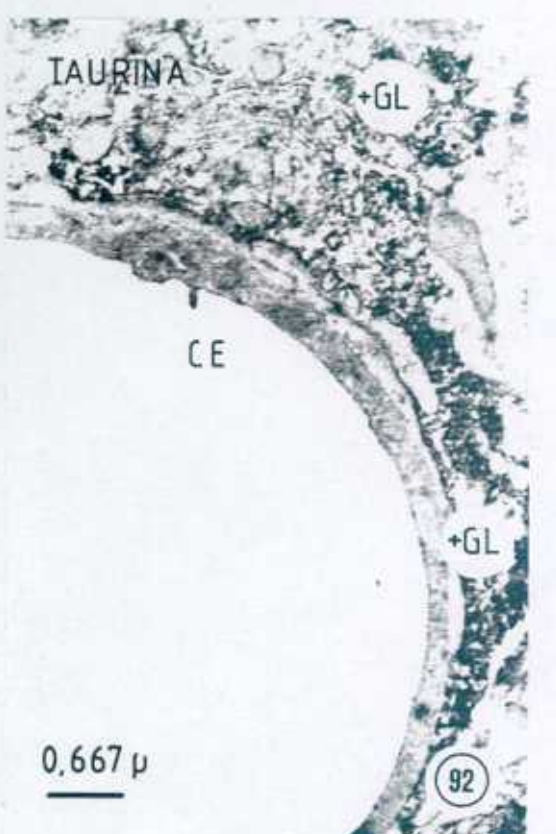
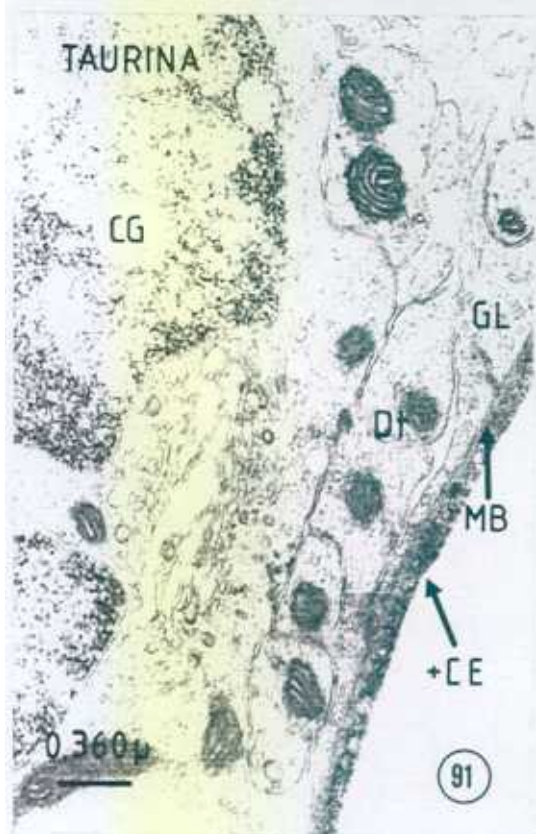
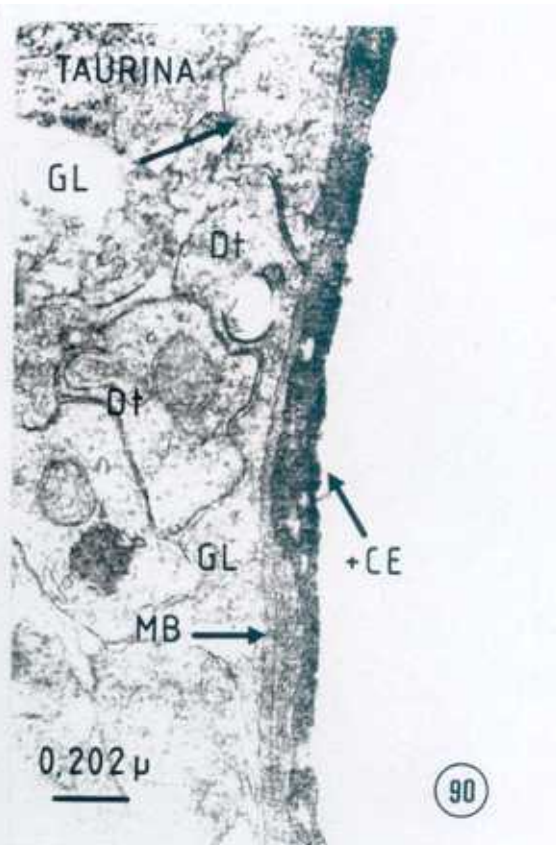
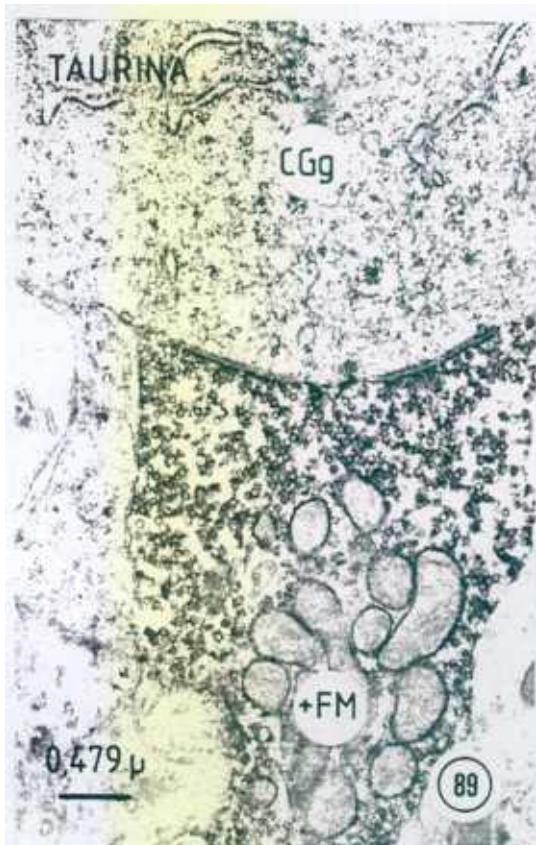
- Fig. 85.-** Inmunolocalización de Taurina en el citoplasma de una célula de Purkinje [CP] en la corteza cerebelosa. El producto de la inmunorreacción se observa principalmente asociado a las estructuras membranosas presentes en el citoplasma. [Ax = Axón].
- Fig. 86.-** Dendrita de una célula de Purkinje [+Dt] en la capa molecular de la corteza cerebelosa. El precipitado denso que revela la presencia del antígeno se observa distribuido homogéneamente en el citoplasma dendrítico.
- Fig. 87.-** Axón de una célula de Golgi [+AGg] inmunomarcado con el antisuero contra Taurina. La reacción se observa asociada a las vesículas sinápticas y a la cara citoplásmica de la membrana mitocondrial externa. [FM = Fibra Musgosa].
- Fig. 88.-** Fibra musgosa [+FM] inmunopositiva frente a Taurina. La reacción aparece asociada a las vesículas sinápticas y a la cara citoplásmica de la membrana mitocondrial externa. [CG = Célula Grano, Dt = Dendrita].





- Fig. 89.-** Inmunolocalización de Taurina en una fibra musgosa [[+FM]] haciendo sinápsis con el citoplasma de una célula Golgi [[CGg]]. La inmunorreacción aparece asociada a las vesículas sinápticas y a la cara citoplásmica de la membrana mitocondrial externa.
- Fig. 90.-** Célula endotelial positiva inmunocitoquímicamente [[+CE]] frente al antisuero contra Taurina en la capa molecular de la corteza cerebelosa. [[GL = Glía, MB = Membrana basal, Dt = Dendrita]].
- Fig. 91.-** Inmunodetección de Taurina en la célula endotelial [[+CE]] de un capilar presente en la capa granular de la corteza cerebelosa. [[MB = Membrana Basal, GL = Glía, Dt = Dendrita, CG = Célula Grano]].
- Fig. 92.-** Prolongación de la glía perivascular positiva frente al antisuero contra Taurina [[+GL]]. La reacción aparece homogéneamente distribuida. [[CE = Célula Endotelial]].





**Fig. 93.-** Inmunolocalización en el microambiente de los capilares cerebelosos de Taurina. La reacción aparece homogéneamente distribuida a lo largo de las prolongaciones gliales [[+GL]]. Nótese la presencia de una terminación axónica [[Ax]] en contacto directo con la membrana basal [[MB]] que rodea al pericito [[PC]] y a la célula endotelial [[CE]].

**Fig. 94.-** Citoplasma dendrítico, posiblemente de una célula de Purkinje, [[+Dt]] en contacto íntimo con la membrana basal [[MB]] que rodea a la pared vascular. [[CE = Célula Endotelial, PC = Pericito, Ax = Axón]].

**Fig. 95.-** Terminación axónica positiva frente a Taurina [[+Ax]] asociada a la pared vascular de un capilar cerebeloso, peroseparada por una delgada vaina glial. [[CE = Célula Endotelial, MB = Membrana Basal, GL = Glía]].



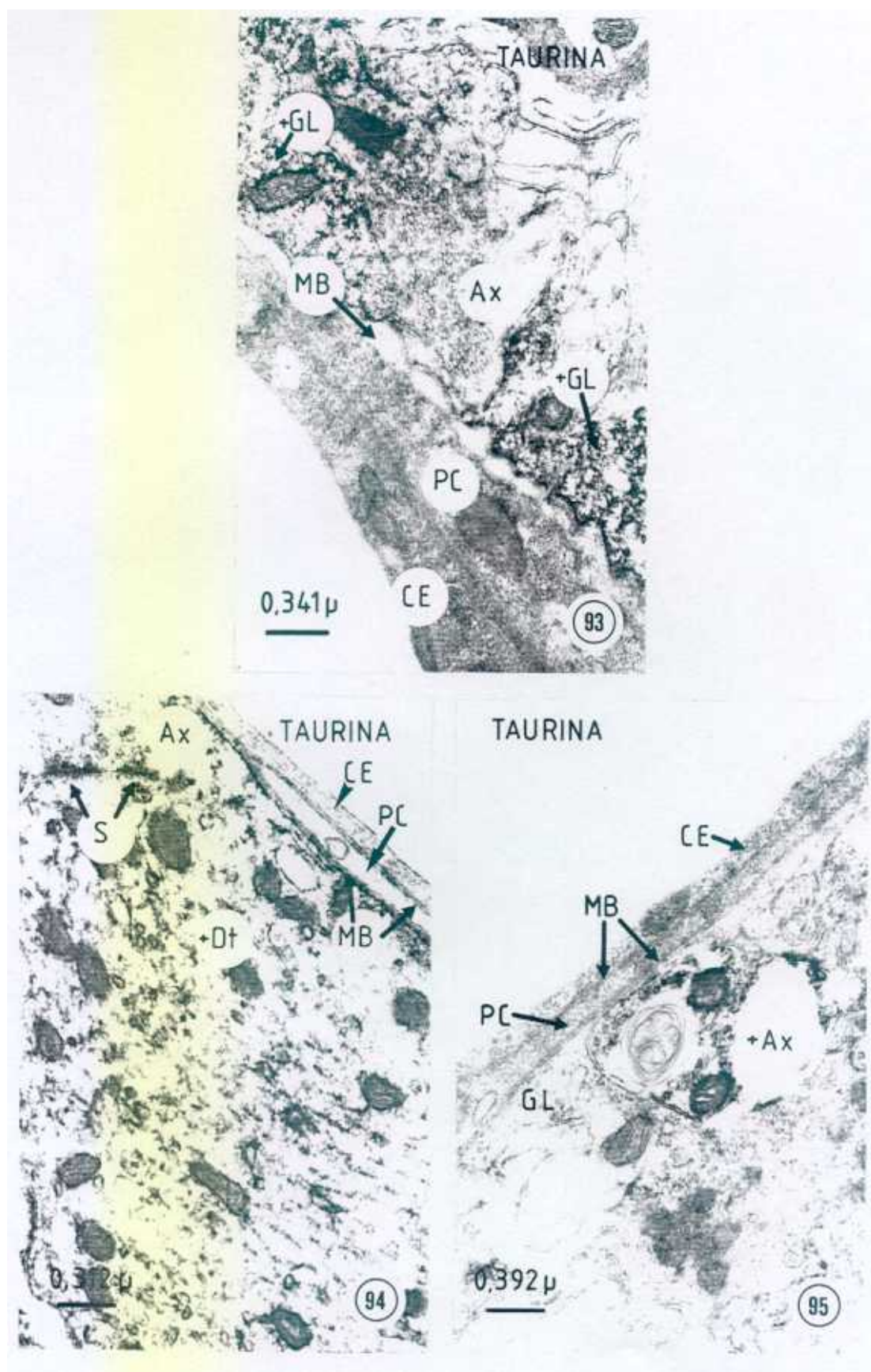


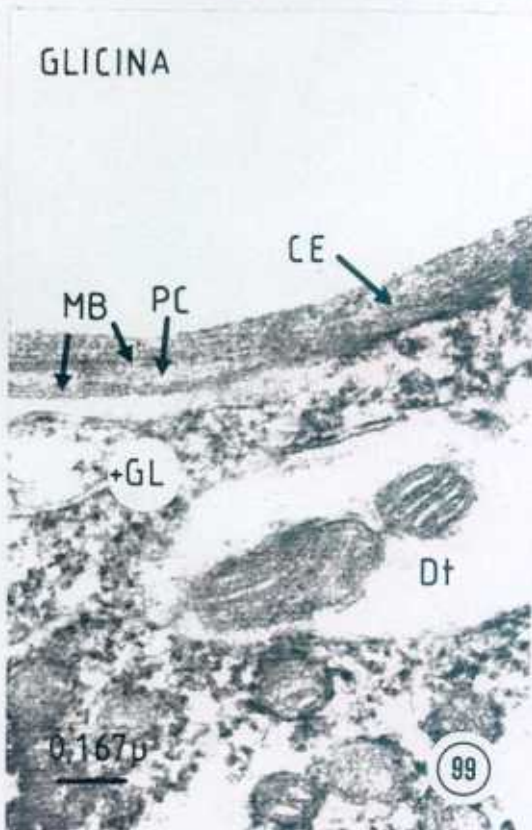
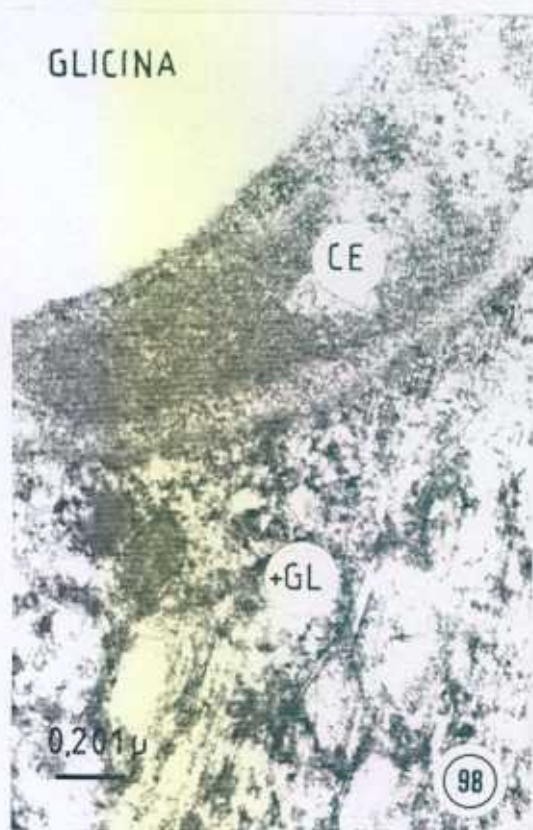
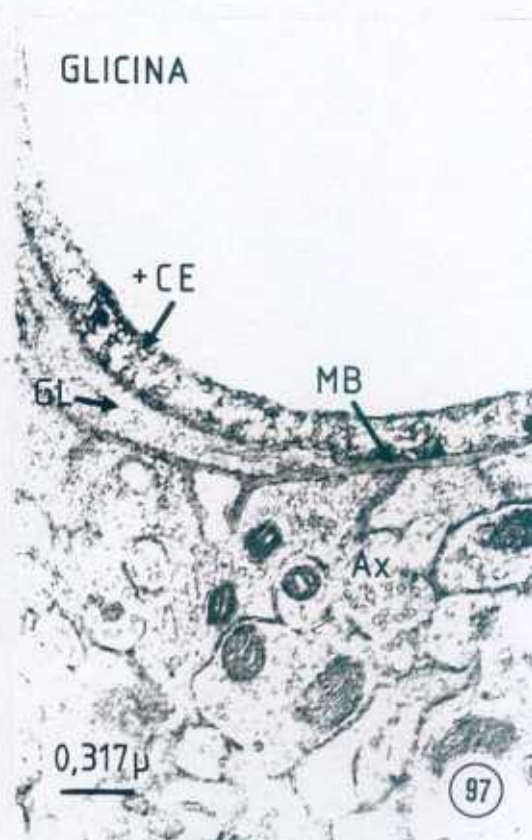
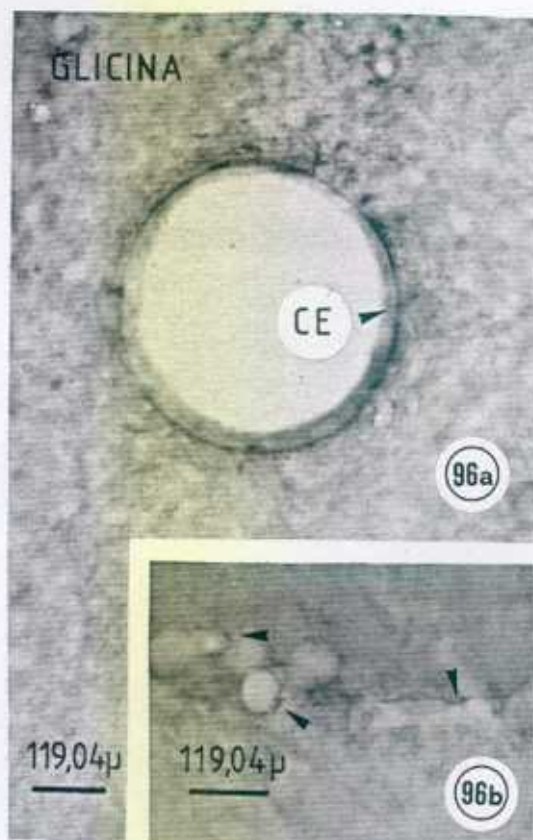
Fig. 96a.- Fotografía a microscopía óptica de la inmunolocalización de Glicina asociada a la pared de un capilar cerebelosos [CE = Célula Endotelial].

Fig. 96b.- Inmunorreacción positiva frente al antisuero contra Glicina en el endotelio capilar y en estructuras celulares asociadas a los capilares cerebelosos [◀].

Fig. 97.- Microfotografía que revela inmunomarcaje contra Glicina en el citoplasma de la célula endotelial [+CE] de un capilar presente en la capa molecular de la corteza cerebelosa. [MB = Membrana Basal, GL = Glía, Ax = Axón]. El producto de la inmunorreacción aparece asociado a las numerosas vesículas membranosas presentes en el endotelio.

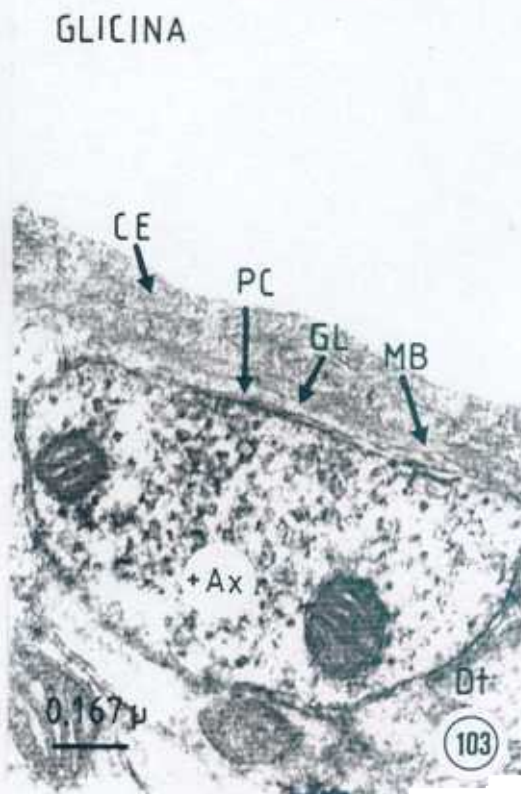
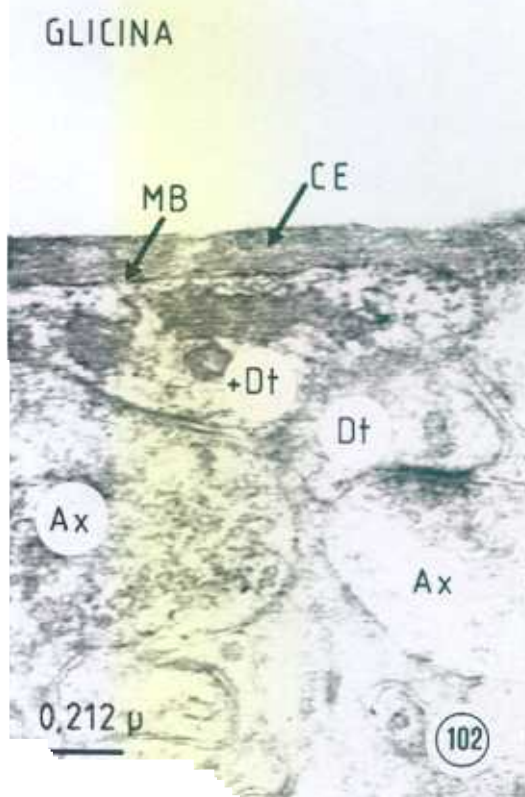
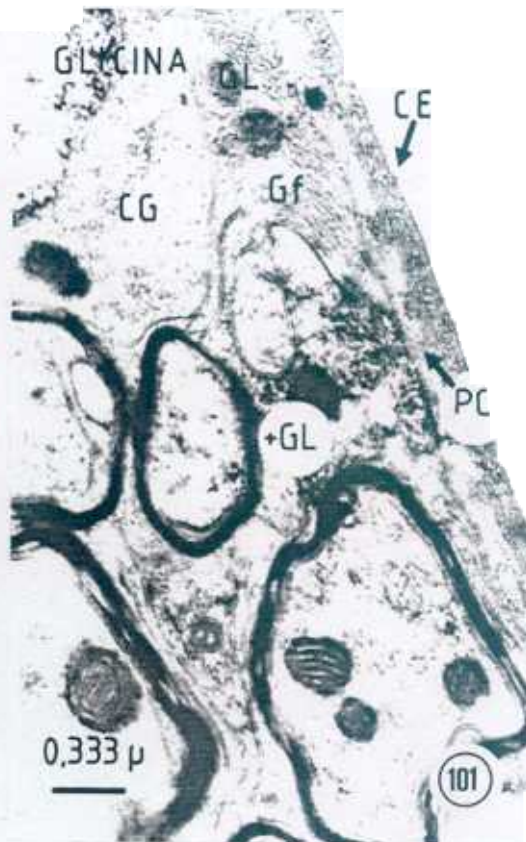
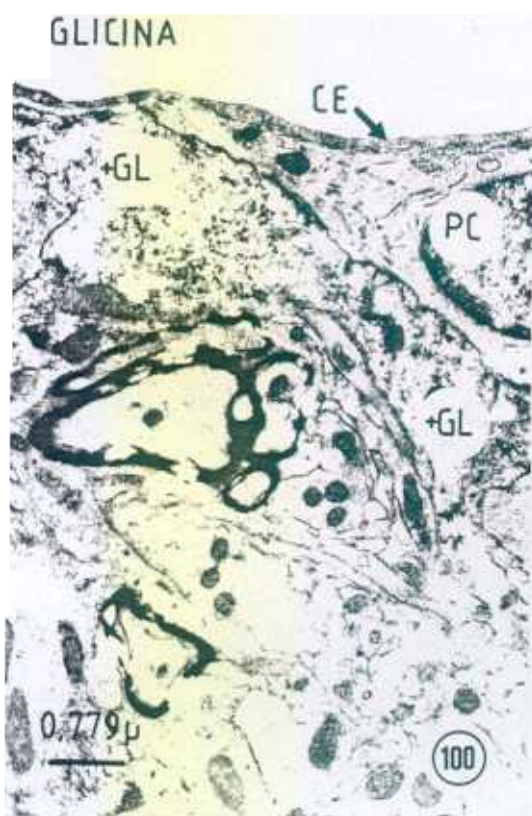
Fig. 98.- Inmunolocalización de Glicina en la glía perivascular [+GL] asociada a la pared capilar.

Fig. 99.- Prolongación glial [+GL] inmunopositiva frente al antisuero contra Glicina asociada a la membrana basal [MB] que envuelve a la pared capilar. [CE = Célula endotelial, PC = Pericito, Dt = Dendrita].



- Fig 100.-** Inmunorreacción positiva frente al antisuero contra Glicina en la glía perivascular **[[+GL]]** que rodea al capilar cerebeloso. **[[CE = Célula Endotelial, PC = Pericito]]**.
- Fig. 101.-** Prolongación glial **[[+GL]]** inmunopositiva frente a Glicina rodeando al capilar presente en la capa granular de la corteza cerebelosa. **[[CE = Célula Endotelial, PC = Pericito, Gf = Gliofilamentos, CG = Célula Grano]]**.
- Fig. 102.-** Immunolocalización de Glicina en un citoplasma dendrítico **[[+Dt]]** asociado íntimamente a la membrana basal **[[MB]]** que rodea a la célula endotelial **[[CE]]**. **[[Ax = Axón]]**.
- Fig. 103.-** Terminación axónica inmunopositiva **[[+Ax]]** frente al antisuero contra Glicina asociada al microambiente del capilar cerebelosos, aunque separado de la membrana basal **[[MB]]** que rodea a la célula endotelial **[[CE]]** y al pericito **[[PC]]** por un delgado envoltorio de naturaleza glial **[[GL]]**. **[[Dt = Dendrita]]**.

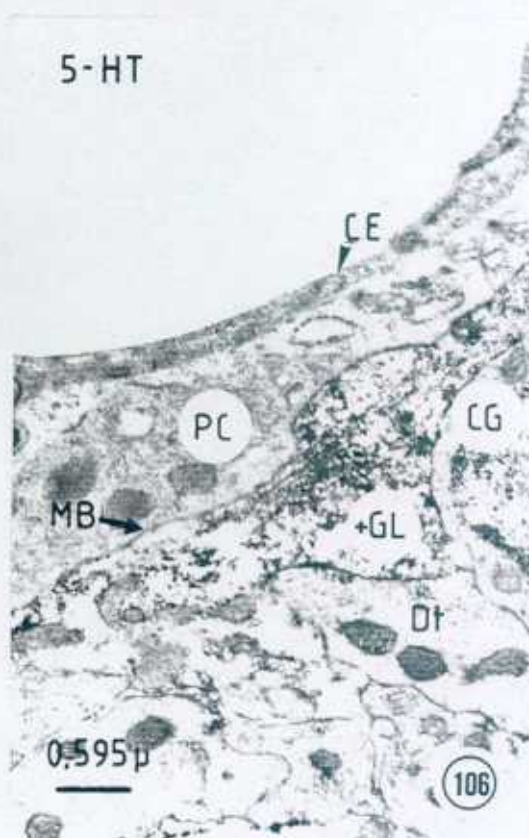
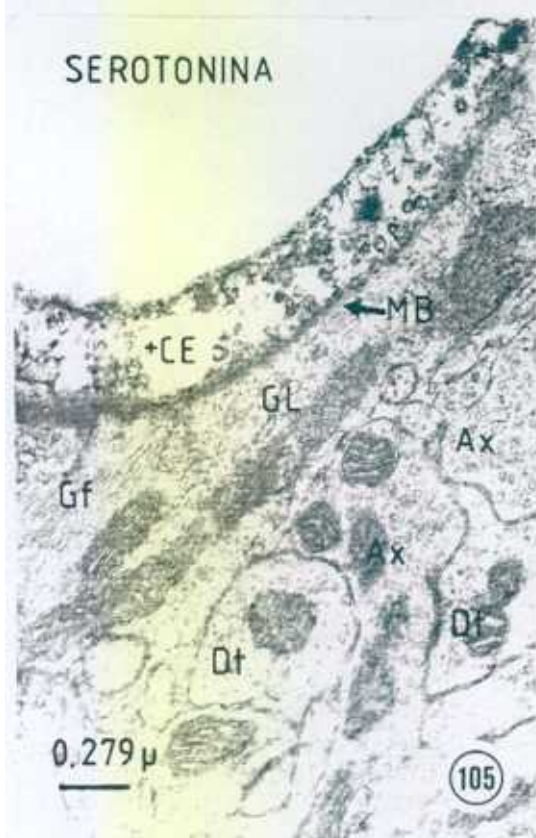
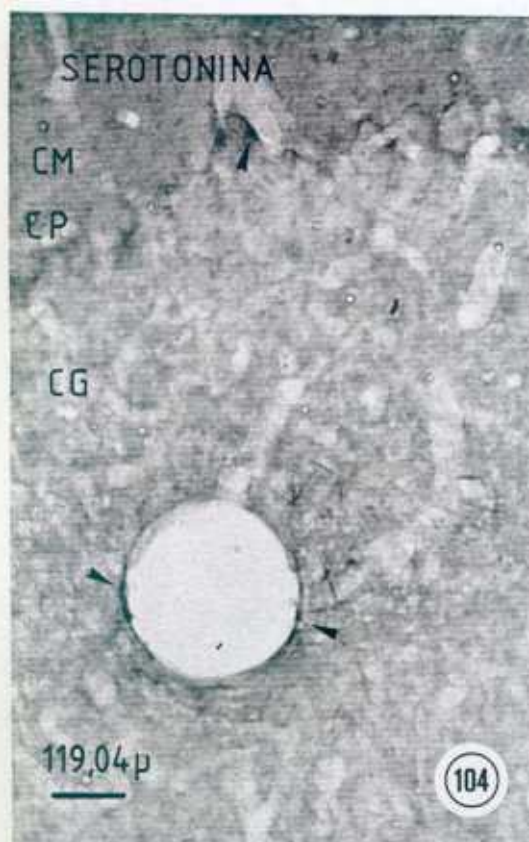




**Fig. 104.-** Detección inmunocitoquímica de Serotonina en la Corteza cerebelosa. Nótese la reacción positiva en el endotelio capilar [▼] y en estructuras asociadas a la pared vascular. [CM = Capa molecular, CP = Células de Purkinje, CG = Capa Granular].

**Fig. 105.-** Célula endotelial positiva inmunocitoquímicamente frente al antisuero contra Serotonina [+CE]. La reacción se observa principalmente asociada a las numerosas vesículas membranosas. [MB = Membrana Basal, GL = Glía, Gf = Gliofilamentos, Ax = terminaciones axónicas, Dt = Dendrita].

**Fig. 106.-** Localización inmunocitoquímica de Serotonina en la glía perivascular [+GL] que rodea a un capilar en la capa granular de la corteza cerebelosa. [CE = Célula Endotelial, PC = Pericito, MB = Membrana Basal, Dt = Dendrita, CG = Célula Grano].



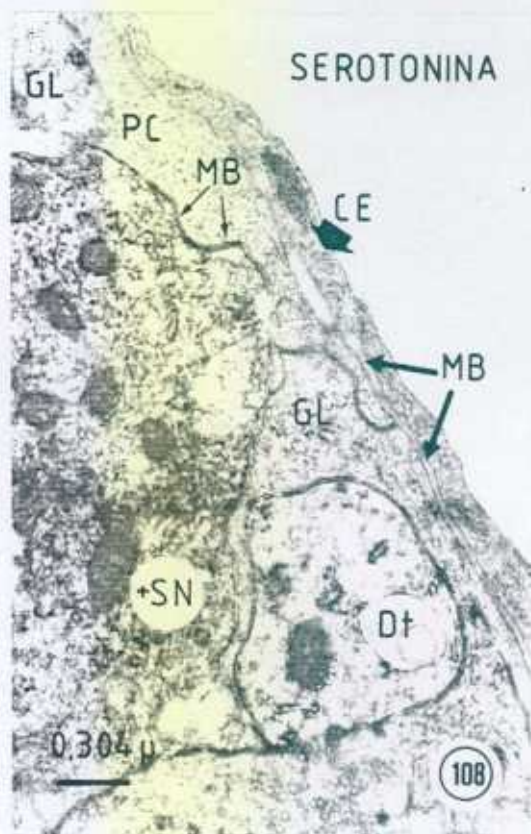
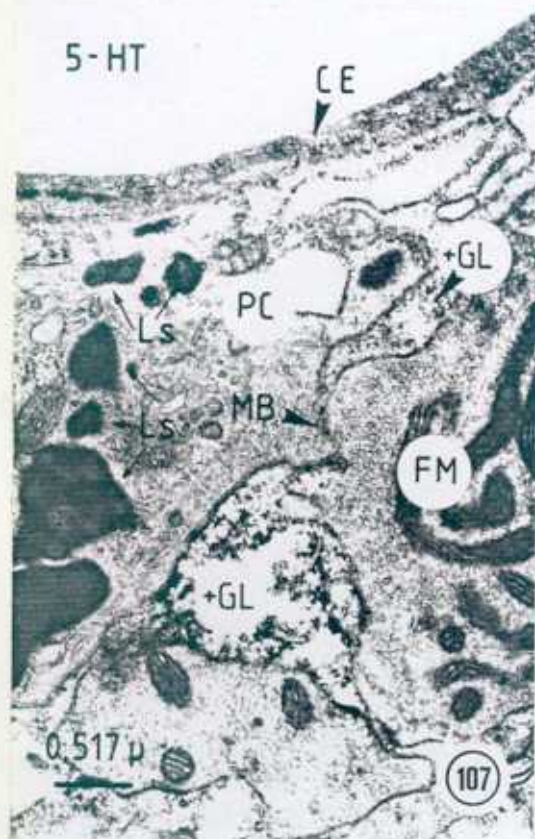
**Fig. 107.-** Prolongaciones gliales inmunopositivas **[[+GL]]** frente al antisuero contra Serotonina rodeando la membrana basal **[[MB]]** que subyace a la pared vascular. Nótese la discontinuidad en el envoltorio glial que permite el contacto entre los elementos vasculares y una fibra musgosa **[[FM]]**. **[[CE = Célula endotelial, PC = Pericito, Ls = Lisosomas]]**.

**Fig. 108.-** Soma neuronal inmunopositivo frente al antisuero contra serotonina **[[+SN]]** en contacto estrecho con la membrana basal **[[MB]]** que rodea a la pared del capilar cerebeloso. **[[CE = Célula Endotelial, PC = Pericito, GL = Glía, Dt = Dendrita]]**.

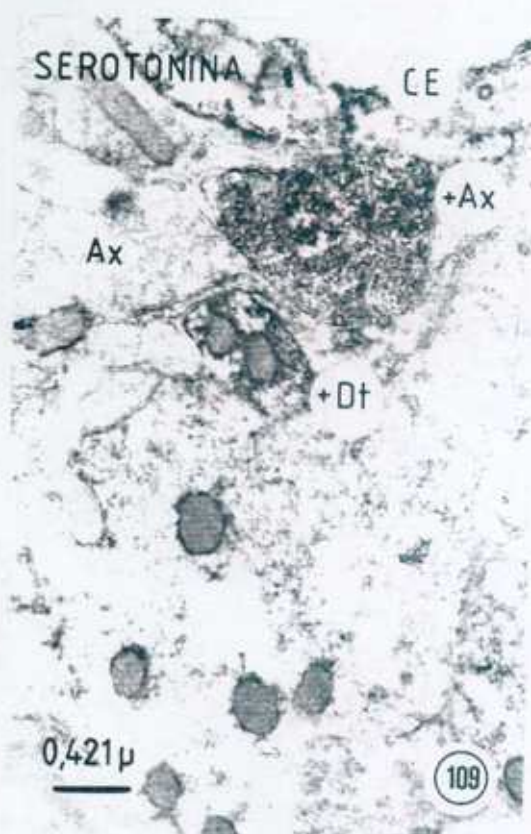
**Fig. 109.-** Inmunodetección de serotonina en una terminación axónica **[[+Ax]]** que mantiene estrecho contacto con la pared vascular. **[[CE = Célula Endotelial, Ax = Axón, Dt = Dendrita]]**.



5-HT



SEROTONINA

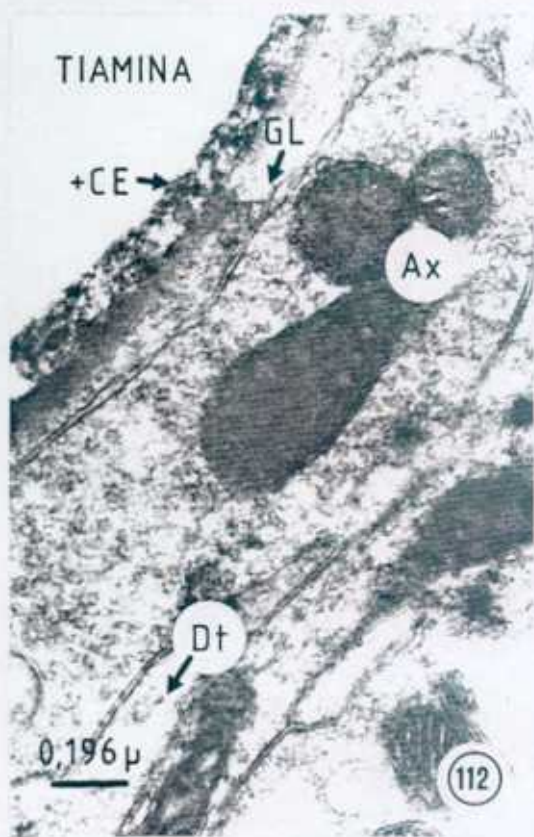
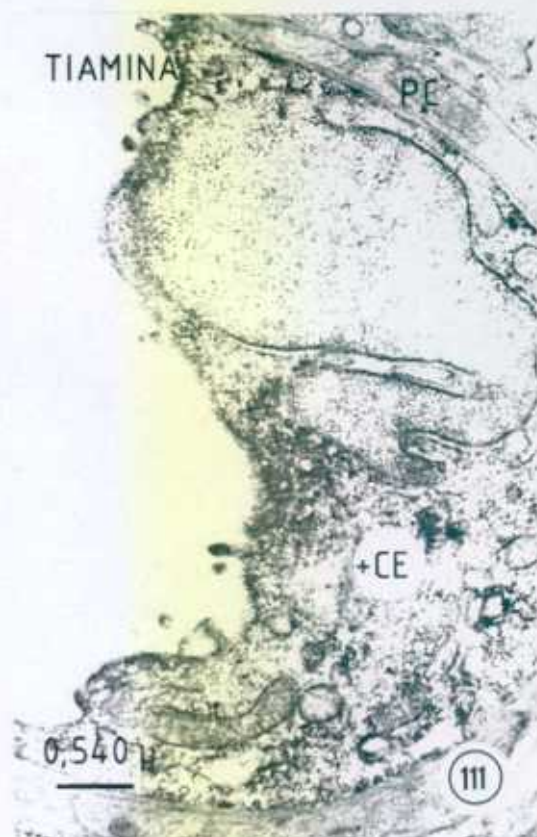
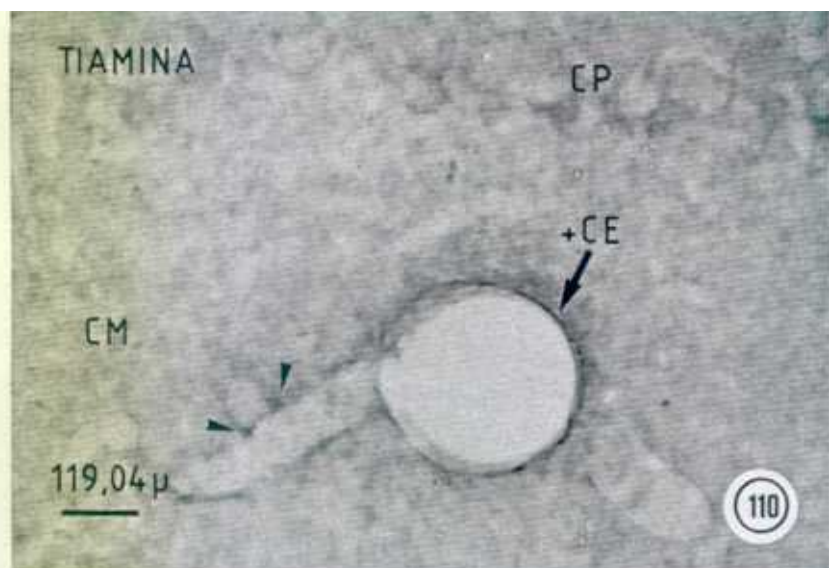


SEROTONINA

**Fig. 110.-** Localización inmunocitoquímica de Tiamina en la célula endotelial de un capilar cerebeloso **[[+CE]]** así como en estructuras celulares en estrecho contacto con la pared vascular **[[▼]]**.

**Fig. 111.-** Microfotografía que muestra el producto de la reacción inmunocitoquímica positiva frente a Tiamina en el citoplasma de la célula endotelial de un capilar cerebeloso **[[+CE]]**. El producto de la inmunorreacción aparece disperso por todo el citoplasma. **[[PC = Pericito]]**.

**Fig. 112.-** Célula endotelial inmunopositiva **[[+CE]]** frente al antisuero contra Tiamina. **[[GL = Glía, Ax = Terminación Axónica, Dt = Dendrita]]**.

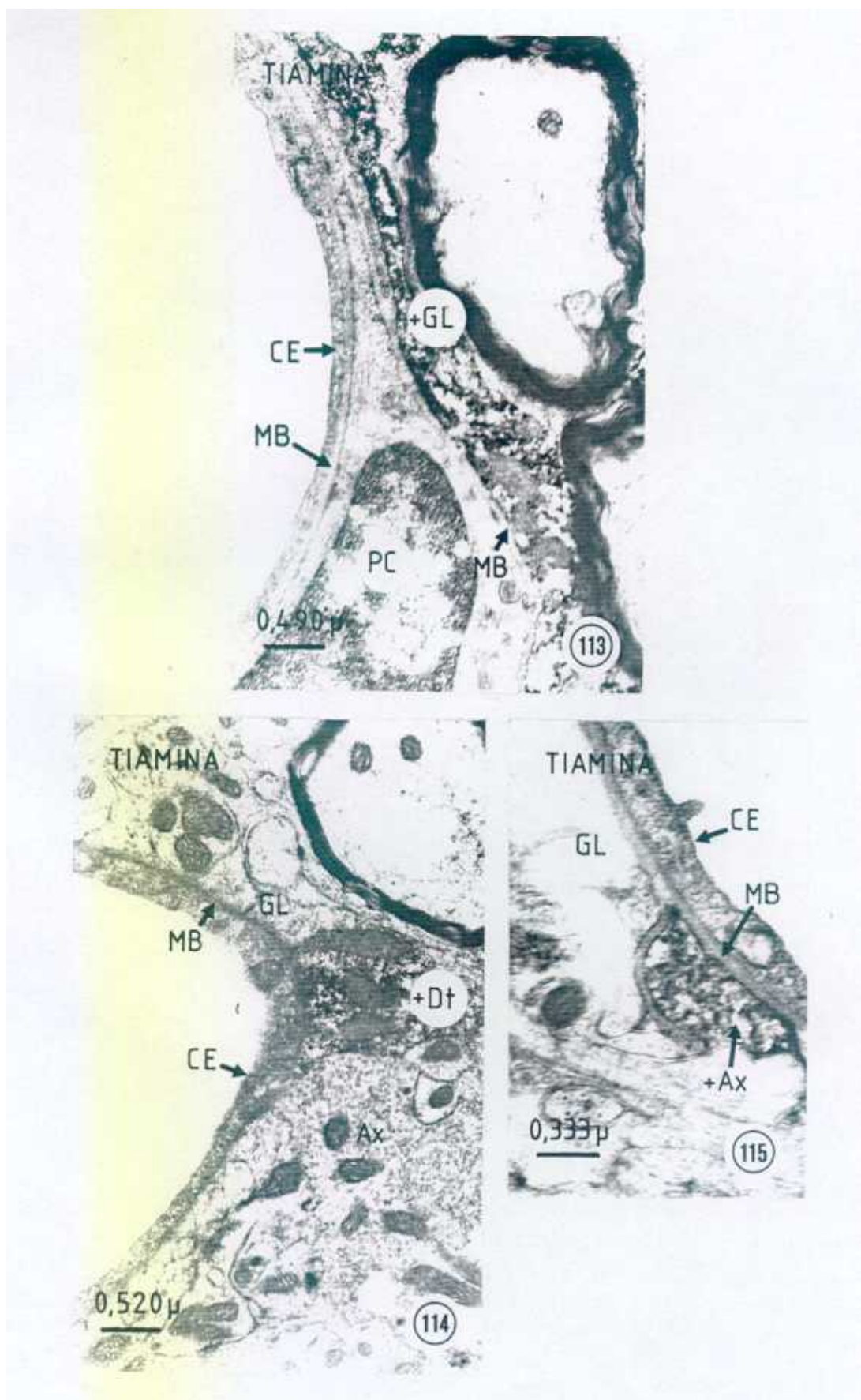


**Fig. 113.-** Inmunodetección de Tiamina en la prolongación glial que se halla rodeando a la pared vascular [[CE = Célula Endotelial, MB = Membrana Basal, PC = Pericito]].

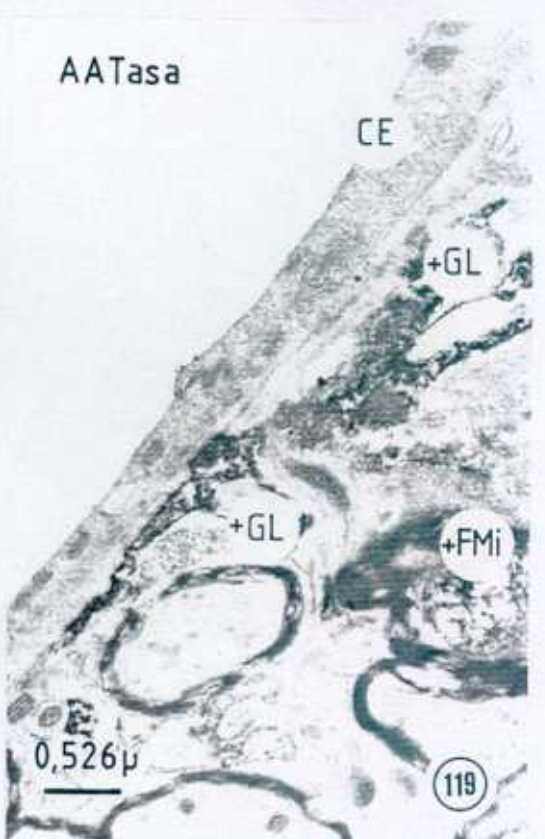
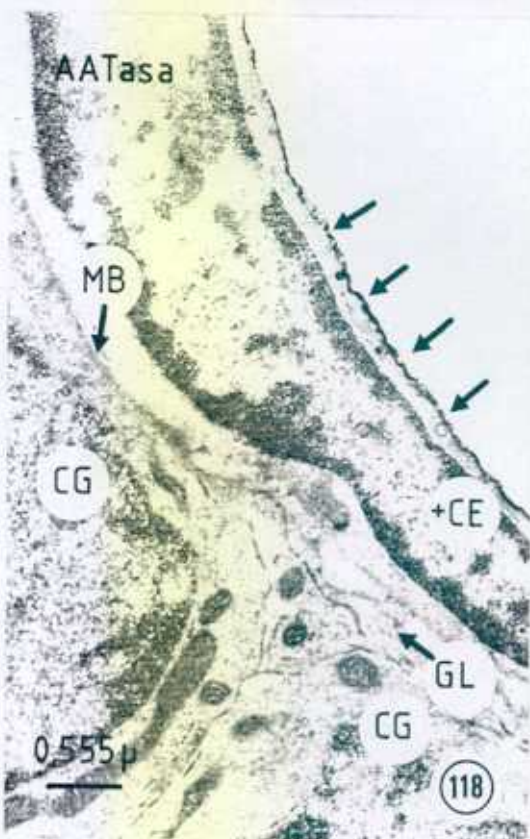
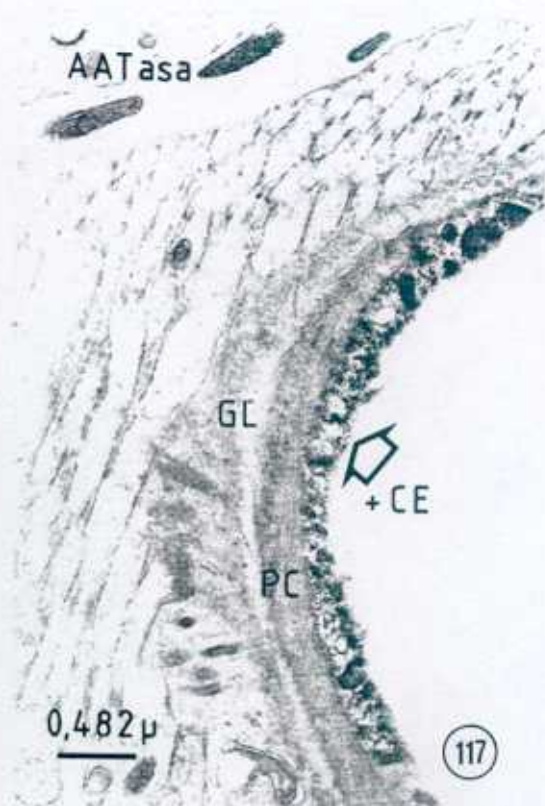
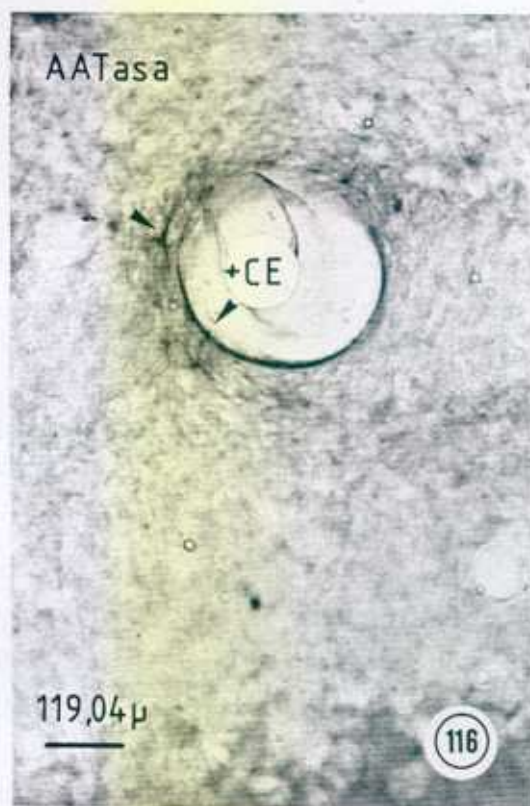
**Fig. 114.-** Localización inmunocitoquímica de Tiamina en el microambiente de los capilares cerebelosos. Obsérvese reacción inmunopositiva en un citoplasma dendrítico [[Dt]], en contacto estrecho con la membrana basal [[MB]] que rodea a la pared vascular. [[CE = Célula Endotelial, Ax = Terminación Axónica, GL = Glía]].

**Fig. 115.-** Terminación axónica inmunopositiva [[+Ax]] frente al antisuero contra Tiamina en contacto íntimo con la membrana basal [[MB]] que rodea a la célula endotelial [[CE]]. [[GL = Prolongación glial]].





- Fig. 116.-** Localización inmunocitoquímica de la enzima AATasa en el citoplasma de una célula endotelial [+CE] y en prolongaciones que alcanzan el capilar cerebeloso.
- Fig. 117.-** Reacción inmunopositiva frente al antisuero contra AATasa en el citoplasma de la célula endotelial [CE] de un capilar cerebeloso. [PC = Pericito, GL = Prolongación Glial]. Obsérvese el producto de la inmunorreacción asociada a las numerosas vesículas membranosas presentes en el endotelio.
- Fig. 118.-** Inmunolocalización de AATasa en la célula endotelial [+CE]. Nótese el producto de la inmunorreacción asociado a la porción luminal del capilar cerebeloso.
- Fig. 119.-** Prolongación glial inmunopositiva frente a antisuero contra AATasa [+GL] asociada a la pared vascular cerebelosa. [CE = Célula Endotelial, +FMi = Fibra Mielínica inmunopositiva].



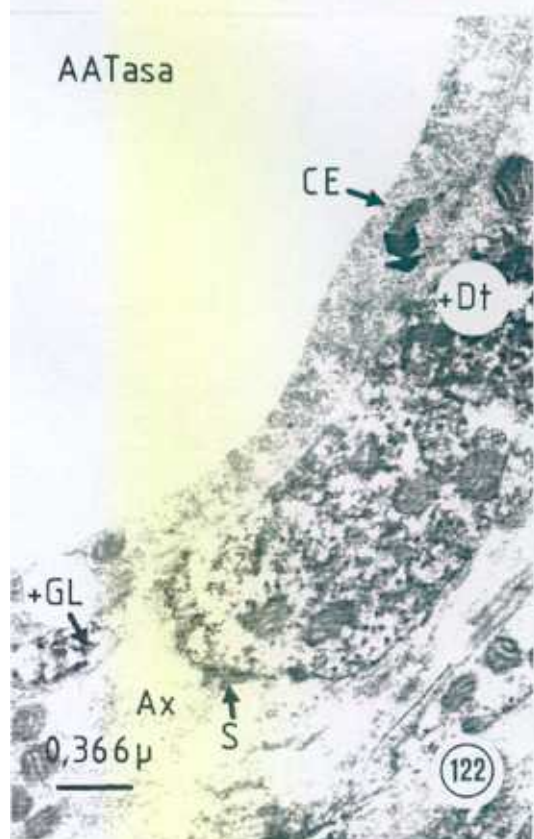
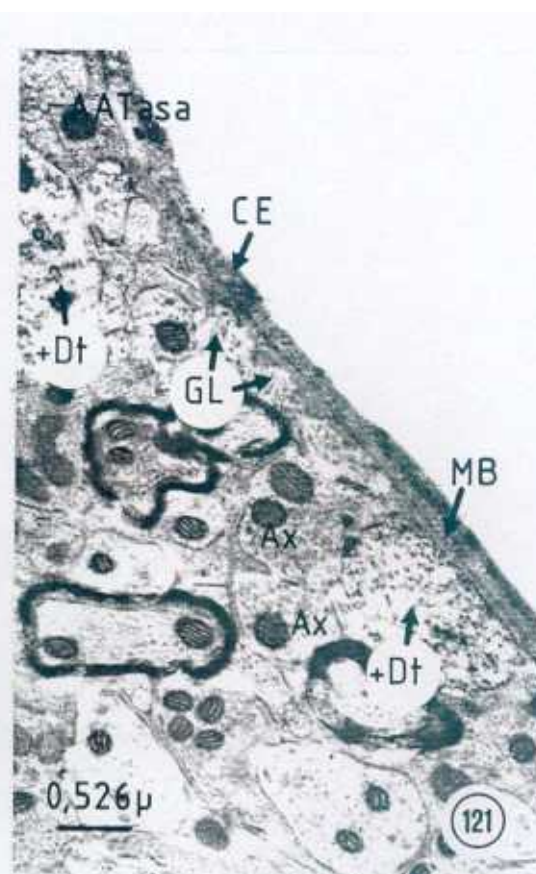
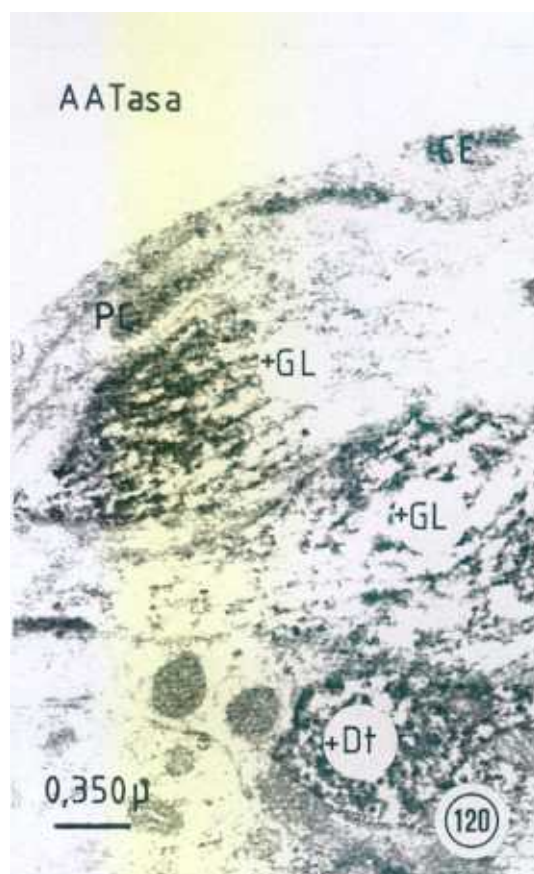
**Fig. 120.-** Reacción inmunopositiva frente al antisuero contra AATasa en las prolongaciones gliales **[[+GL]]** que rodean al capilar cerebeloso. Obsérvese reacción positiva en el citoplasma de una dendrita **[[+Dt]]**. **[[CE = Célula Endotelial, PC = Pericito]]**.

**Fig. 121.-** Prolongaciones dendríticas inmunopositivas frente al antisuero contra AATasa **[[+Dt]]**, asociada en algún caso a la membrana basal **[[MB]]** que rodea a la pared capilar **[[CE = Célula endotelial, GL = Glía, Ax = Terminación axónica]]**.

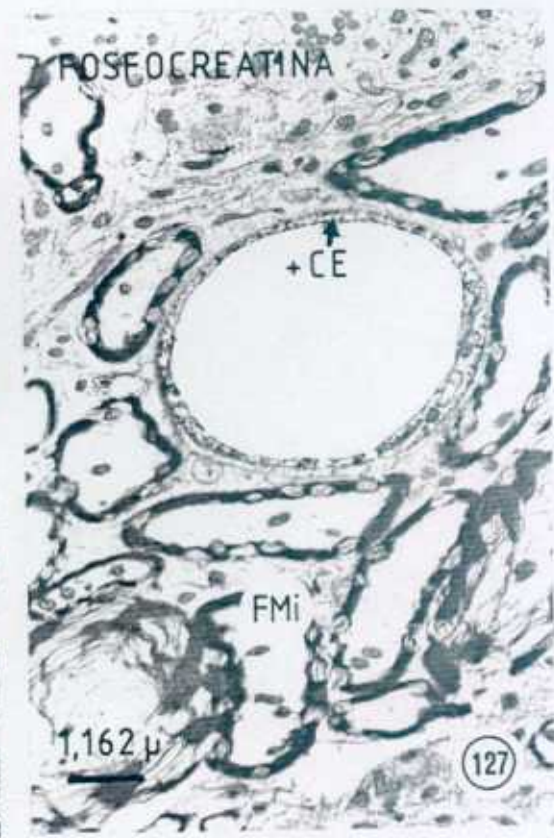
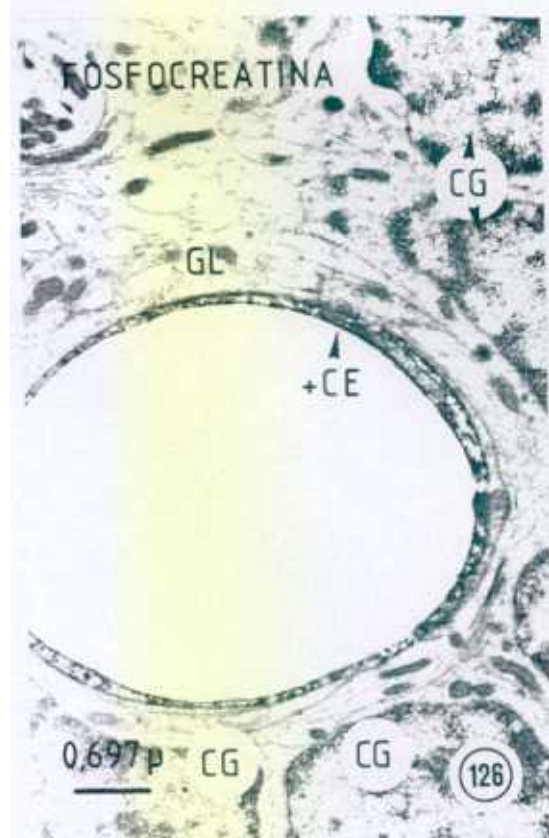
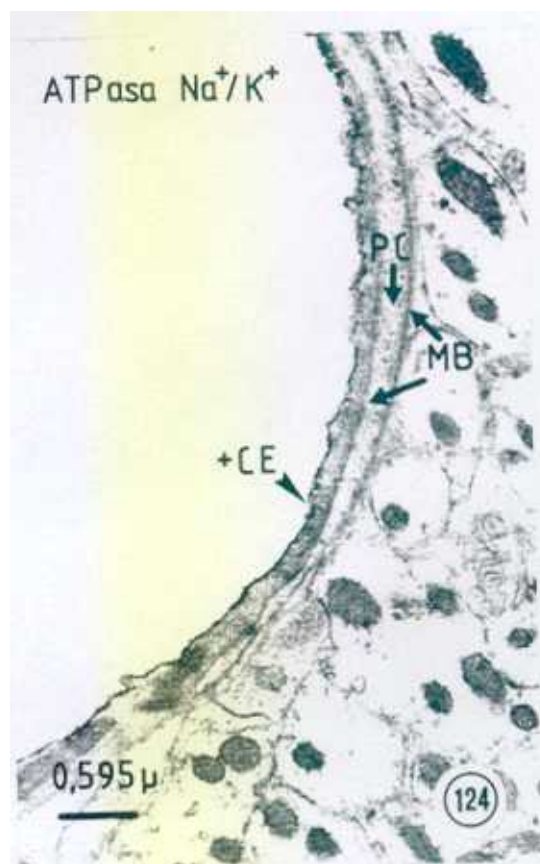
**Fig. 122.-** Inmunodetección de AATasa en un citoplasma dendrítico **[[+Dt]]** asociado de forma íntima a la pared del capilar cerebeloso. Obsérvese reacción inmunopositiva también en glía perivascular **[[+GL]]**. **[[CE = Célula Endotelial, GL = Glía, Ax = Axón, S = Sinapsis]]**.

**Fig. 123.-** Terminación axónica inmunorreactiva frente al antisuero contra AATasa **[[+Ax]]** asociada de forma íntima a la membrana basal **[[MB]]** que rodea a la célula endotelial **[[CE]]**. Nótese reacción positiva en glía perivascular cercana **[[+GL]]**. **[[Dt = Dendrita]]**.





- Fig. 124.-** Localización inmunocitoquímica de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en la célula endotelial del capilar cerebelosos. Nótese el precipitado denso del producto de la inmunorreacción asociado a la porción luminal de la célula endotelial **[[+CE]]**. **[[PC = Pericito, MB = Membrana Basal]]**.
- Fig. 125.-** Inmunodetección de fosfocreatina en la capa molecular de la corteza cerebelosa. El producto de la reacción inmunocitoquímica se demuestra en el citoplasma de la célula endotelial **[[+CE]]**. **[[GL = Prolongaciones Gliales]]**.
- Fig. 126.-** Célula endotelial inmunopositiva **[[+CE]]** frente al antisuero contra fosfocreatina en la capa granular de la corteza cerebelosa. **[[GL = Prolongaciones Gliales, CG = Célula Grano]]**.
- Fig. 127.-** Microfotografía que muestra la reacción inmunopositiva del endotelio de un capilar cerebeloso **[[+CE]]**, presente en la sustancia blanca. **[[FMi = Fibra Mielínica]]**.

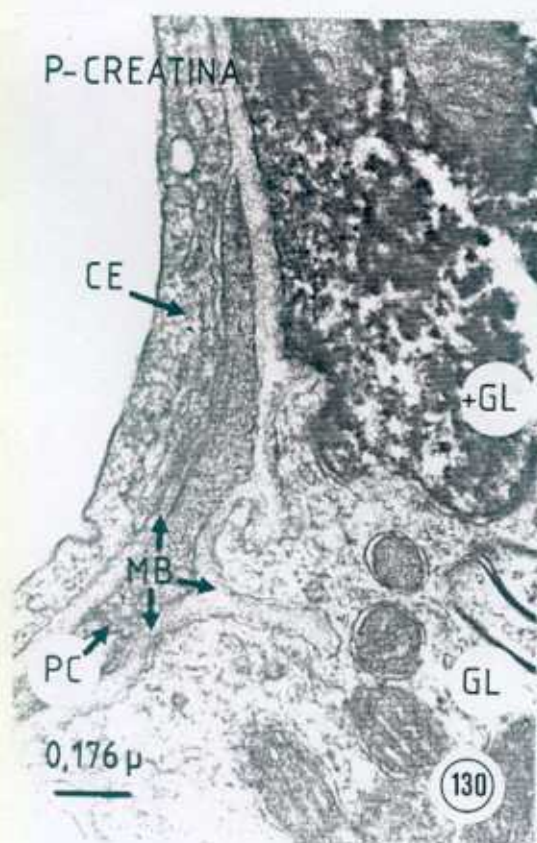
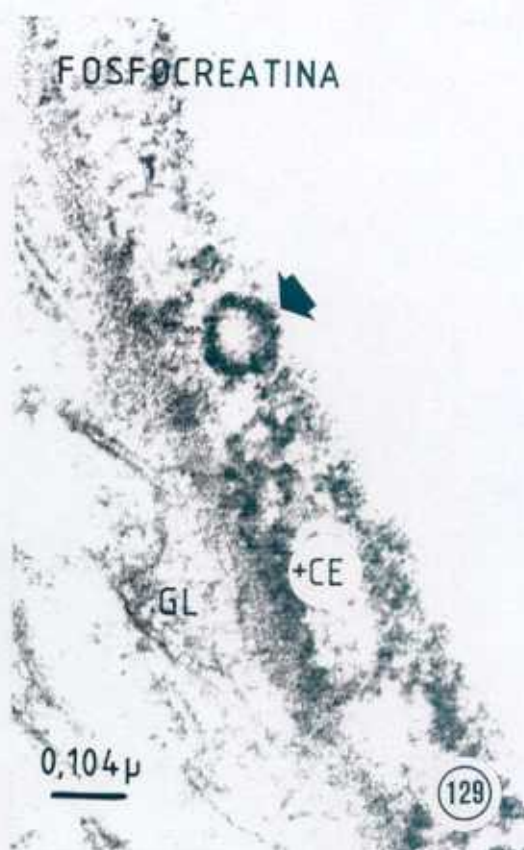
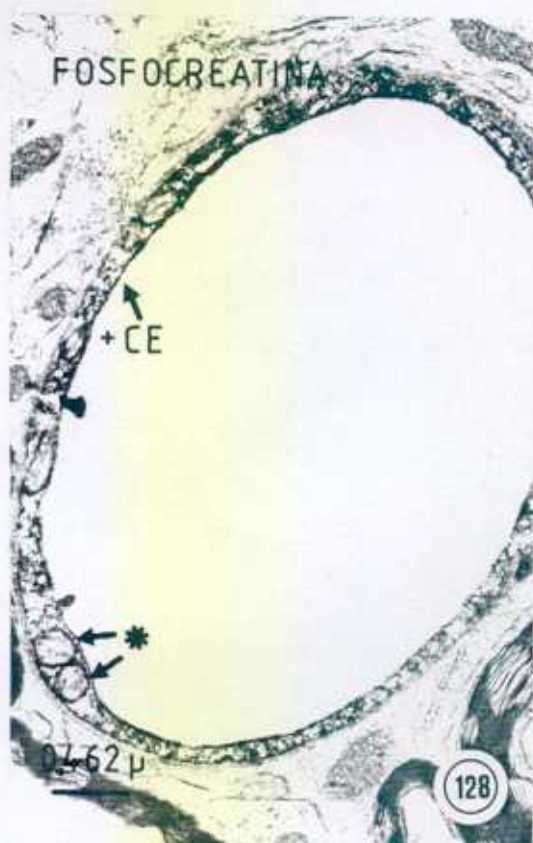


**Fig. 128.-** Localización inmunocitoquímica de fosfocreatina en el endotelio de un capilar cerebeloso **[[+CE]]**. Obsérvese el producto de la inmunorreacción asociado a la cara citoplásmica de la membrana mitocondrial externa **[[\*]]**.

**Fig. 129.-** Detalle ultraestructural del producto de la inmunorreacción, frente al antisuero contra fosfocreatina, asociada a la porción citoplásmica de una vesícula presente en el endotelio vascular **[[+CE]]**.

**Fig. 130.-** Inmunolocalización de fosfocreatina en una prolongación glial **[[+GL]]** que abraza al capilar cerebelosos en su porción abluminal. **[[CE = Célula Endotelial, MB = Membrana Basal, PC = Pericito, GL = Glía]]**.



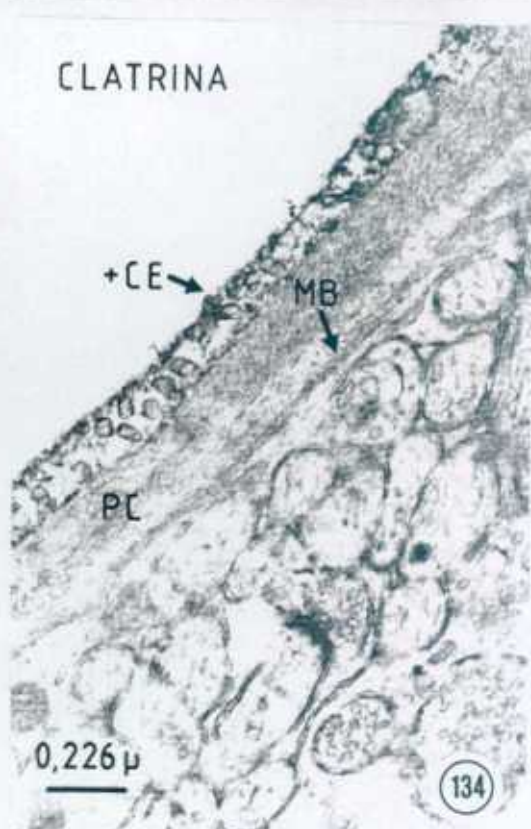
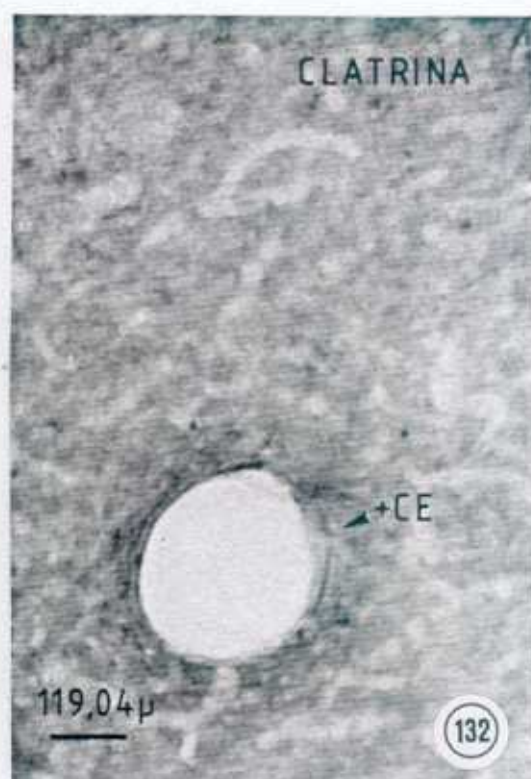
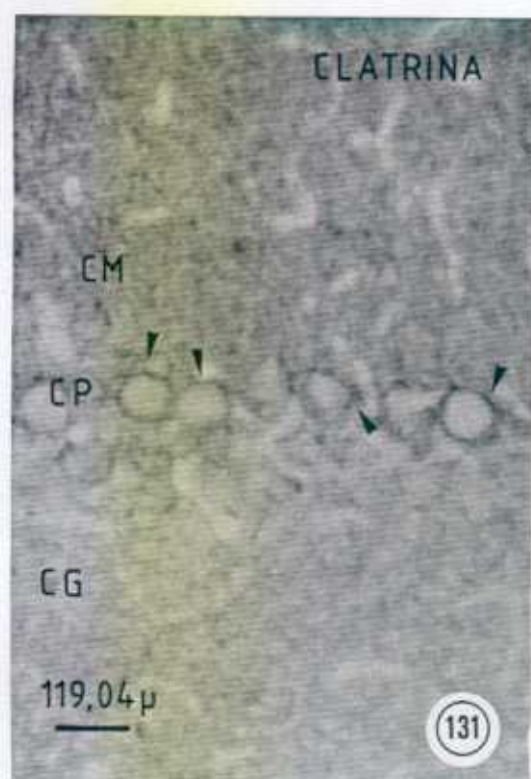


**Fig. 131.-** Localización inmunocitoquímica de clatrina en la corteza cerebelosa. Obsérvese el producto de la inmunorreacción asociada a las células de Purkinje [▼]. [CM = Capa Molecular, CP = Células de Purkinje, CG = Capa Granular].

**Fig. 132.-** Inmunodetección de clatrina en el endotelio de un capilar cerebeloso [+CE].

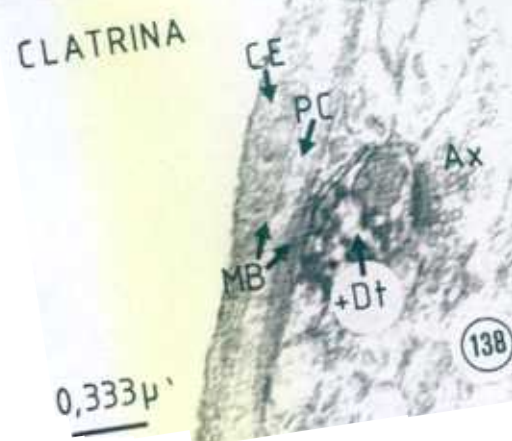
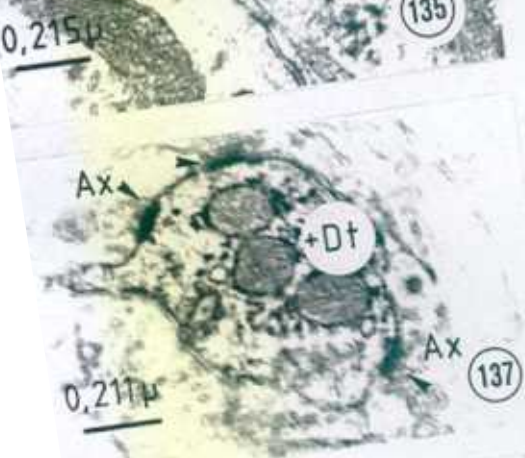
**Fig. 133.-** Microfotografía de la distribución del producto de la inmunorreacción positiva frente a clatrina en la porción luminal de la célula endotelial [+CE]. [PC = Pericito, GL = Prolongación Glial, CP = Célula de Purkinje].

**Fig. 134.-** Reacción inmunocitoquímica positiva frente al antisuero contra fosfocreatina en la célula endotelial [+CE]. Nótese el producto de la inmunorreacción asociado a las numerosas vesículas presentes en el endotelio. [PC = Pericito, MB = Membrana Basal].



- Fig. 135.-** Microfotografía que muestra reacción inmunocitoquímica positiva en la prolongación glial  $[[+GL]]$  frente al antisuero contra clatrina. La reacción se observa homogéneamente distribuida en el citoplasma glial.  $[[CE = \text{Célula Endotelial}, MB = \text{Membrana Basal}, PC = \text{Pericito}]]$ .
- Fig. 136.-** Localización inmunocitoquímica de clatrina en la corteza cerebelosa. El producto de la inmunorreacción aparece en el citoplasma de una célula de Purkinje  $[[+SN]]$  asociada a la membrana basal  $[[MB]]$  que rodea a la célula endotelial  $[[CE]]$ . Nótese, así mismo, reacción en la glía perivascular  $[[+GL]]$ .  $[[GL = \text{Glía}, Ax = \text{Axón}, Dt = \text{Dendrita}, PC = \text{Pericito}]]$ .
- Fig. 137.-** Dendrita inmunopositiva frente al antisuero contra clatrina  $[[+Dt]]$ . Nótese la existencia de contactos sinápticos  $[[\blacktriangledown]]$ .  $[[Dt = \text{Dendrita}]]$ .
- Fig. 138.-** Inmunodetección de clatrina en una dendrita  $[[+Dt]]$  separada del endotelio cerebral mediante glía perivascular.  $[[CE = \text{Célula Endotelial}, PC = \text{Pericito}, MB = \text{Membrana Basal}, Ax = \text{Axón}]]$ .
- Fig. 139.-** Terminación axónica inmunopositiva  $[[+Ax]]$  frente al antisuero contra clatrina, separada de la pared capilar por el envoltorio de glía perivascular  $[[GL]]$ . Nótese el producto de la inmunorreacción asociado a las vesículas sinápticas.  $[[CE = \text{Célula Endotelial}, PC = \text{Pericito}, MB = \text{Membrana Basal}, Dt = \text{Dendrita}]]$ .





**Fig. 140.-** Reacción inmunopositiva frente al antisuero contra clatrina en glía perivascular **[[+GL]]** y en la zona de contacto entre el endotelio y una terminación axónica **[[Ax]]**. Obsérvese así mismo reacción positiva en la porción luminal de la célula endotelial **[[+CE]]**. **[[MB = Membrana Basal, Dt = Dendrita]]**.

**Fig. 141.-** Localización inmunocitoquímica de  $\alpha$ -actina en la corteza cerebelosa. Obsérvese el producto de la reacción inmunocitoquímica en relación con las células de Purkinje **[[▼]]**.

**Fig. 142.-** Reacción inmunopositiva frente al antisuero contra  $\alpha$ -actina en el endotelio del capilar cerebeloso y en prolongaciones celulares que alcanzan la pared vascular **[[▲]]**.

**Fig. 143.-** Célula endotelial positiva inmunocitoquímicamente **[[+CE]]** frente al antisuero contra  $\alpha$ -actina. Nótese la presencia de uniones de tipo «gap» entre la célula endotelial y el pericito **[[◄]]**. **[[PC = Pericito, GL = Prolongaciones Dendríticas, Ax = terminales axónicos, Dt= dendritas, CG = Células Grano]]**.

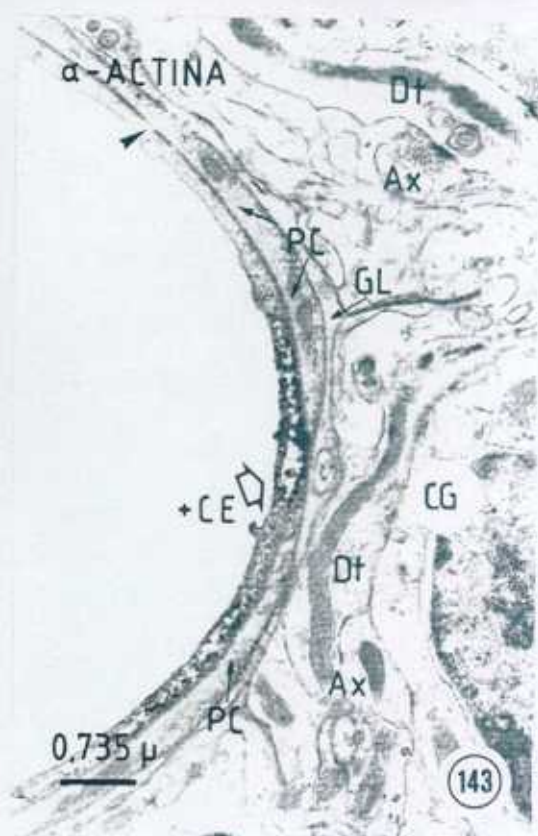
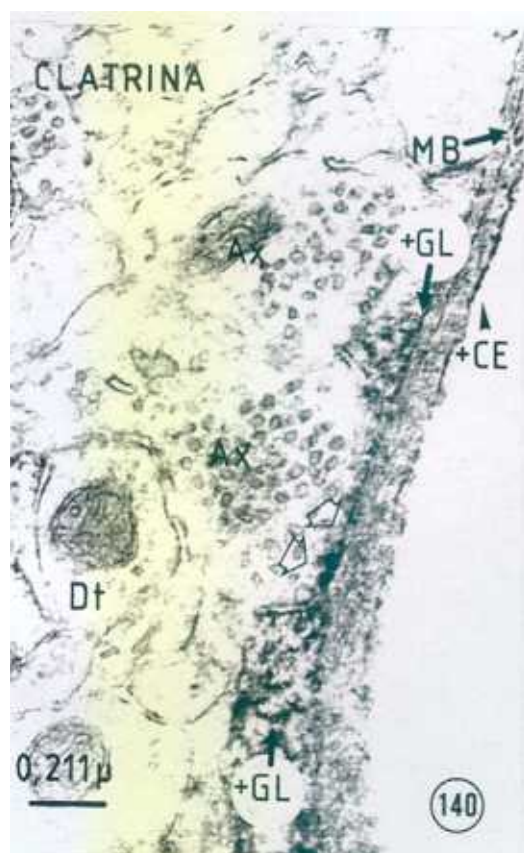


Fig. 144.- Inmunorreacción positiva frente al antisuero contra  $\alpha$ -actina en el endotelio del capilar cerebeloso [[+CE]]. Nótese el producto de la reacción asociado a las numerosas vesículas membranosas presentes en el endotelio. [[GL = Prolongación Glial]].

Fig. 145.- Reacción inmunocitoquímica positiva [[▲]] frente a  $\alpha$ -actina en la cara citoplásmica de una formación de tipo vesicular [[Fv]] en el pericito [[PC]] de un capilar cerebeloso. [[CE = Célula endotelial, MB = Membrana basal]].

Fig. 146.- Microfotografía que demuestra la presencia de reacción inmunopositiva frente a  $\alpha$ -actina en las prolongaciones de la glía perivascular [[+GL]]. [[CE = Célula Endotelial, PC = Pericito, MB = Membrana Basal]].

Fig. 147.- Proyección glial inmunopositiva frente a  $\alpha$ -actina [[+GL]] rodeando el capilar cerebeloso. Obsérvese el producto de la inmunorreacción asociado a los haces de gliofilamentos [[Gf]] y al citoplasma glial que contacta con la membrana basal y rodeando a las mitocondrias. [[CE = Célula Endotelial]].



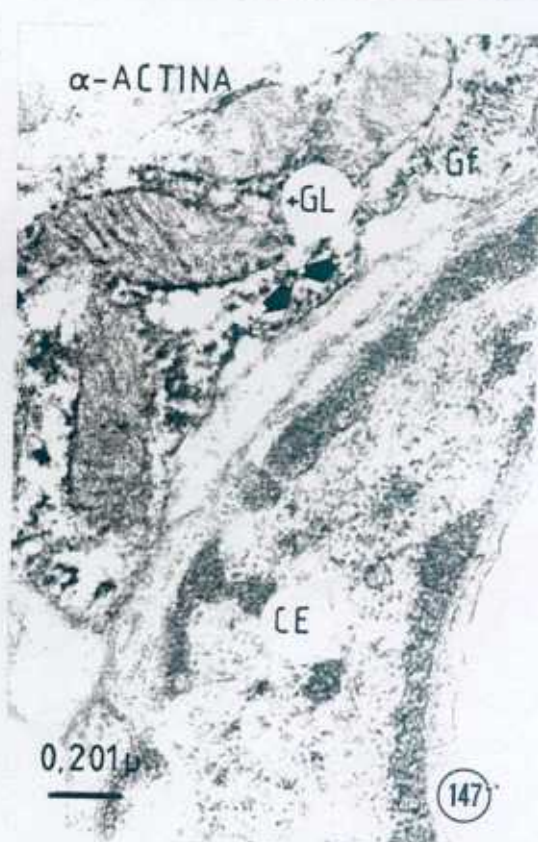
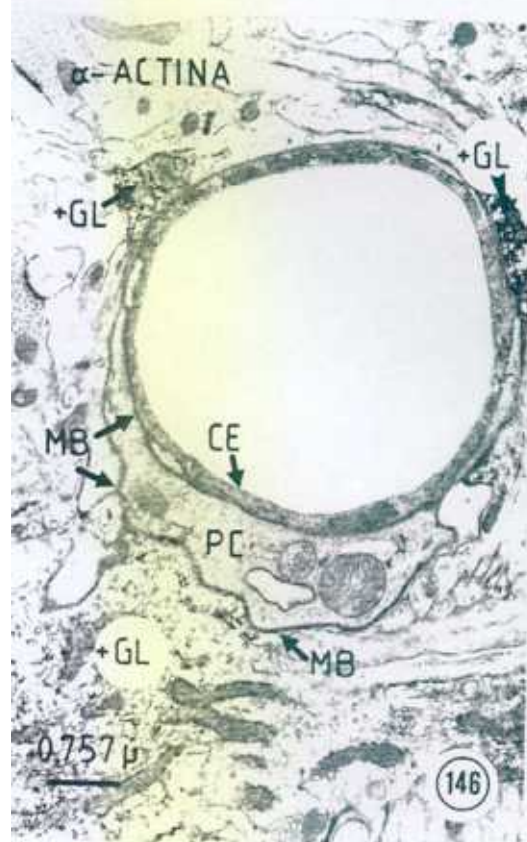
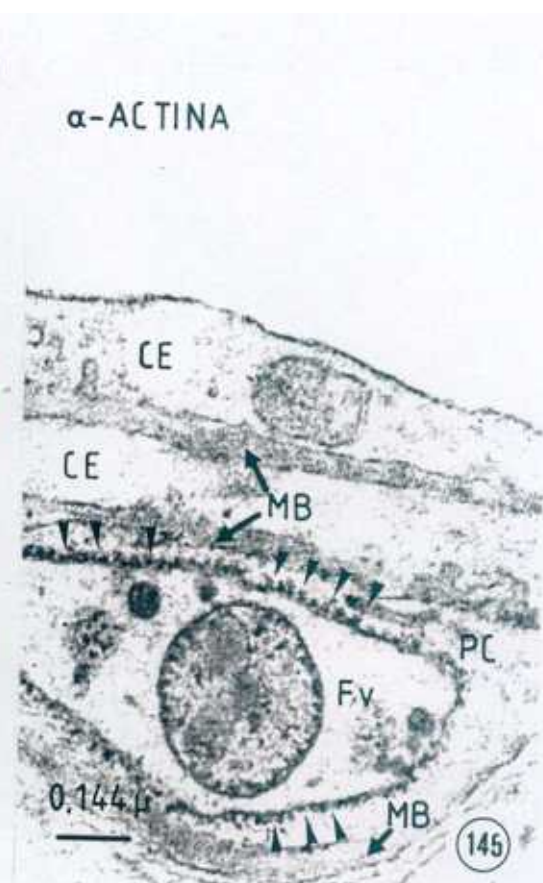
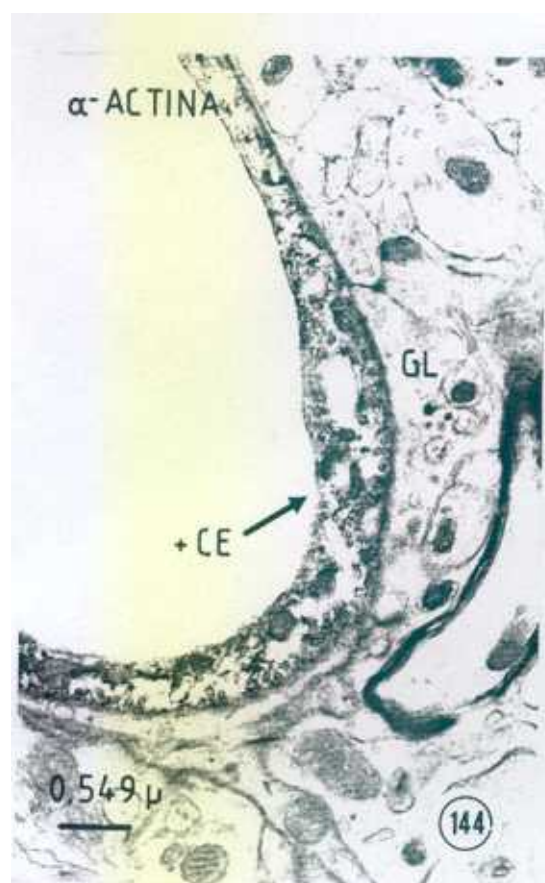
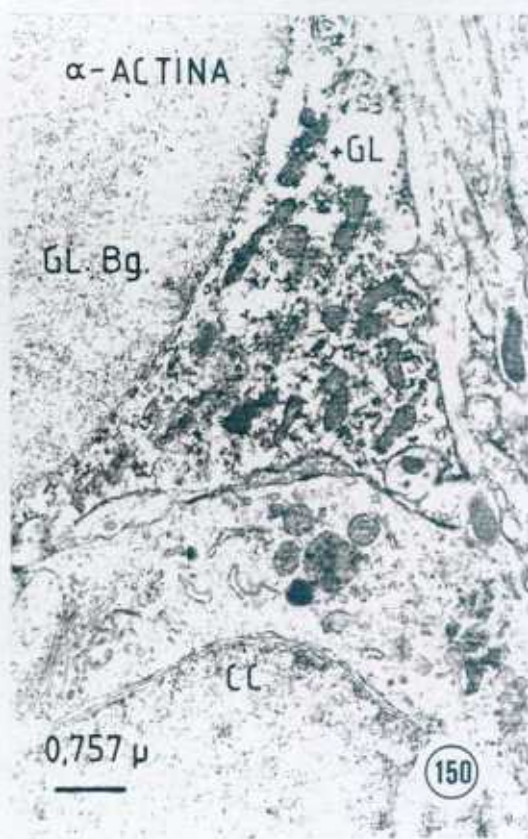
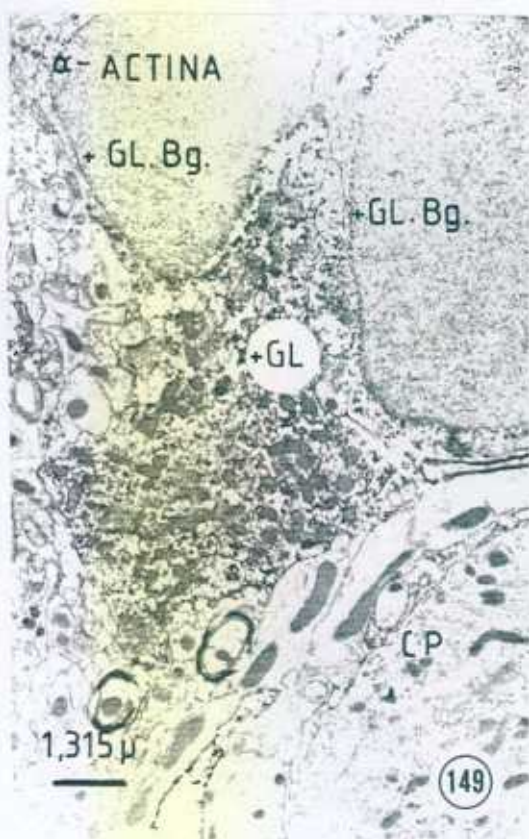


Fig. 148.- Inmunolocalización de  $\alpha$ -actina en el microambiente de los capilares cerebelosos. Nótese reacción inmunopositiva en la glía perivascular [[+GL]], asociada a los orgánulos citoplásmicos, mitocondrias y sistemas endomembranosos. [[CE = Célula Endotelial, MB = Membrana Basal, Dt = Citoplasmas Dendríticos, Ax = Botones axónicos]].

Fig. 149.- Glía de Bergmann positiva inmunocitoquímicamente frente al antisuero contra  $\alpha$ -actina [[+GL.Bg]]. El producto del revelado aparece disperso por todo el citoplasma glial [[+GL]]. [[CP = Célula de Purkinje]].

Fig. 150.- Detalle ultraestructural de una célula de la Glía de Bergmann [[GL.Bg]] positiva inmunocitoquímicamente frente a  $\alpha$ -actina [[+GL]]. Obsérvese el producto de la Oinmunorreacción asociado a las mitocondrias y al sistema de endomembranas. [[CC = Célula Cesto]].



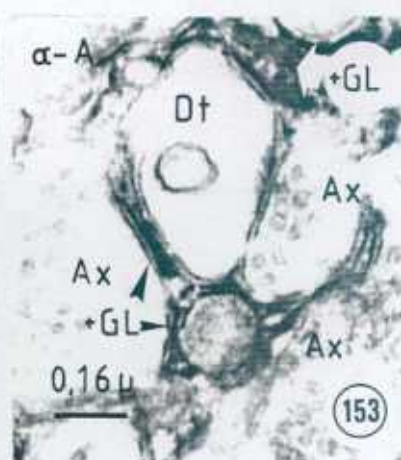
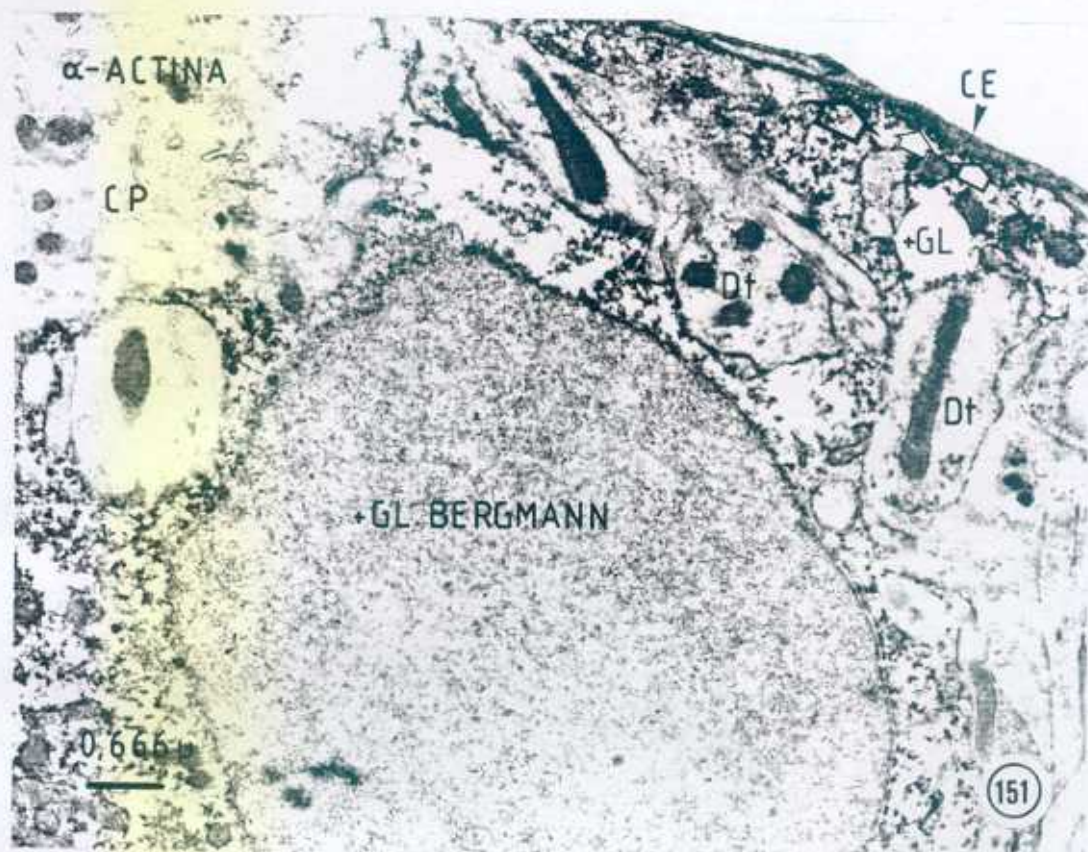


**Fig. 151.-** Microfotografía de la localización de  $\alpha$ -actina en el microambiente del capilar cerebelosos. La reacción inmunocitoquímica se demuestra dispersa en el citoplasma de la glía de Bergmann [+GL] y asociada a la pared del capilar cerebeloso. Obsérvese la presencia de reacción asociada a la membrana glial en contacto con la membrana basal que rodea a la célula endotelial [CE]. [Dt = Dendrita, CP = Célula de Purkinje].

**Fig. 152.-** Célula estrellada positiva inmunocitoquímicamente [+CE] frente al antisuero contra  $\alpha$ -actina.

**Fig. 153.-** Inmunorreacción positiva frente al antisuero contra  $\alpha$ -actina en las prolongaciones gliales [+GL] que se hallan rodeando a los elementos pre- y post-sinápticos. [Ax= botón axónico, Dt = Dendrita].





**Fig. 154.-** Inmunolocalización de  $\alpha$ -actina en el microambiente de los capilares cerebelosos. El revelado de la inmunorreacción aparece tanto en la glía perivascular  $[[+GL]]$ , en citoplasmas dendríticos  $[[+Dt]]$  asociados y no asociados a la pared vascular y en estructuras gliales rodeando a los elementos nerviosos.  $[[CE = \text{Célula Endotelial}, PC = \text{Pericito}, MB = \text{Membrana Basal}, Ax = \text{Axón}]]$ .

**Fig. 155.-** Glía perivascular  $[[+GL]]$  y terminación axónica  $[[+Ax]]$  inmunopositivas frente al antisuero contra  $\alpha$ -actina. El producto de la inmunorreacción aparece respectivamente disperso y asociado a las vesículas sinápticas presentes en el terminal  $[[CE = \text{Célula endotelial}, PC = \text{Pericito}]]$ .

